

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM REVERZIBILNÍ ADSORPCE NUKLEOVÝCH KYSELIN NA
MAGNETICKÝCH NOSIČÍCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETR ŠÁLEK

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM REVERZIBILNÍ ADSORPCE NUKLEOVÝCH KYSELIN NA MAGNETICKÝCH NOSIČÍCH

STUDY OF REVERSIBLE ADSORPTION OF NUCLEIC ACIDS ON MAGNETIC CARRIERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETR ŠÁLEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

FCH-DIP0229/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Šálek Petr

Studijní program

Chemie a technologie potravin (M2901)

Studijní obor

Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)

Vedoucí diplomové práce

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Konzultanti diplomové práce

Název diplomové práce:

Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na magnetických nosičích

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Petr Šálek
student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

V diplomové práci byla studována reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na magnetických mikročásticích za různých experimentálních podmínek. Byly použity magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) a magnetické sklo. Cílem bylo získat kyselinu deoxyribonukleovou (DNA) v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR).

Pro návázání DNA na magnetické mikročástice byla navozena kondenzace DNA, což bylo dosaženo přidáním PEG a chloridu sodného do separační směsi. Byly použity PEG různé molekulové hmotnosti a to 600, 6000 a 8000 a různá výsledná koncentrace PEG v separační směsi (4, 8, 12, 16%). K ověření podmínek adsorpce DNA byly použity modelové systémy : DNA z kuřecích erytrocytů a purifikovaná DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCDM 211/06. S rostoucí molekulovou hmotností a výslednou koncentrací PEG vzrůstalo množství eluované DNA. Získané poznatky byly využity při izolaci DNA z hrubých lyzátů buněk čisté bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCDM 211/06 a při izolaci DNA z reálných vzorků (tekuté mléčné výrobky, tvrdý sýr). Přítomnost cílové DNA v eluátu byla ověřena pomocí rodově (rod *Lactobacillus*) nebo druhově specifické (druh *Bifidobacterium longum*) PCR.

Dále bylo při separaci DNA z reálných vzorků (tekutých mléčných výrobků) ověřeno použití dvoufázového vodného systému se současnou adsorpcí kondenzované DNA na tuhé magnetické částice. Byly studovány podmínky tvorby dvoufázového vodného systému, který byl vytvořen 16% PEG o různé molekulové hmotnosti (600, 6000 a 8000 g/mol) a síranem amonným o různých koncentracích. Následně bylo zjišťováno, zda použití dvoufázového systému s adsorpcí kondenzované DNA na tuhé magnetické částice má vliv na citlivost stanovení cílové DNA bakterií mléčného kvašení v reálných vzorcích (tj. zda byl eliminován vliv inhibitorů PCR). Předpoklad o zvýšení citlivosti PCR byl potvrzen.

Abstract

Reversible adsorption of nucleic acids on magnetic carriers was studied in this diploma thesis. Magnetic P(HEMA-*co*-GMA) microspheres and magnetic glass particles were used. The aim of the study was to isolate DNA in suitable quality for polymerase chain reaction (PCR).

Adsorption of DNA on magnetic carriers was achieved after DNA condensation by PEG and NaCl in separation mixture. PEGs of various molecular weight (600, 6000 and 8000 g/mol) and different concentrations of PEG in separation mixture (4, 8, 12, 16%) were used. Quantity of eluted DNA increased with molecular weight and concentration of PEG in separation mixtures. Optimized experimental conditions were applied for the separation of DNA from chicken erythrocytes, purified DNA, DNA in crude lysates of bacterial cells of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCDM 211/06 and from real samples (liquid dairy products, hard cheese). The presence of target DNA in eluates was tested using genus specific PCR (genus *Lactobacillus*) or species specific PCR (species *Bifidobacterium longum*).

Aqueous two-phase system (liquid-liquid) was used for separation of DNA from real samples, too. At first the conditions aqueous two-phase system creation were studied. It was created by 16% PEG of various molecular weight (600, 6000 and 8000 g/mol) and by various concentration of ammonium sulphate. Reversible DNA adsorption on carboxyl group-containing magnetic nonporous P(HEMA-*co*-EDMA) microspheres for the isolation PCR-ready DNA from liquid dairy products containing PCR inhibitors was studied, too. The quality of isolated DNA was checked by PCR amplification. The presumption on the elimination of PCR inhibitors from DNA samples was confirmed.

Klíčová slova

DNA, magnetické mikročástice, NaCl, PCR, poly(ethylen glykol).

Keywords

DNA, magnetic nanoparticles, NaCl, PCR, poly(ethylene glycol).

ŠÁLEK, P. *Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na magnetických nosičích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 68 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:
Velmi děkuji svému vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za odborné vedení, za všechny nabyté zkušenosti a nejen za to. Toto poděkování také patří i paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc.

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	3
KLÍČOVÁ SLOVA.....	4
KEYWORDS.....	4
PROHLÁŠENÍ	5
ÚVOD.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 NUKLEOVÉ KYSELINY	10
1.1.1 DNA.....	10
1.1.1.1 Replikace DNA	11
1.2 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	13
1.2.1.1 Rozdělení rodu <i>Lactobacillus</i> z hlediska jejich metabolismu	14
Fermentace	14
1.2.1.2 Význam a využití rodu <i>Lactobacillus</i>	15
1.2.2 Charakteristika rodu <i>Bifidobacterium</i>	15
1.2.2.1 Význam a využití rodu <i>Bifidobacterium</i>	15
1.3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	16
1.3.1.1 Princip PCR.....	16
1.4 ELEKTROFORÉZA	18
1.5 ULTRAFIALOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE	19
1.6 OVLIVŇOVÁNÍ PRŮBĚHU PCR INHIBITORY	19
1.6.1 Falešně pozitivní výsledky.....	19
2.6.2.1. Mechanismus působení inhibitorů	20
1.7 BIOSEPARACE POMOCÍ DVOUFÁZOVÉHO SYSTÉMU	21
1.8 ADSORPCE NUKLEOVÝCH KYSELIN NA PEVNÉ ČÁSTICE.....	22
1.8.1 Aplikace magnetických částic pro separaci vysokomolekulární genomové DNA.....	22
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
2.1 MATERIÁL A METODY	23
2.1.1 Použité mikroorganismy a DNA pro optimalizaci.....	23
2.1.2 Chemikálie	23
2.1.2.1 Chemikálie	23
3.1.2.3 Komponenty a chemikálie pro PCR	23
2.1.3 Roztoky a media	24
2.1.3.1 Kultivační medium	24
2.1.3.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů	24
2.1.3.3 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu	24
2.1.3.4 Roztoky pro izolaci DNA.....	25
2.1.4 Přístroje a pomůcky	25
2.1.5 Metody.....	25
2.1.5.1 Příprava hrubých lyzátů z čisté bakteriální kultury	25

2.1.5.2	Izolace DNA z tekutých mléčných výrobků.....	26
2.1.5.3	Izolace DNA ze vzorku tvrdého sýru	26
2.1.5.4	Fenolová extrakce.....	26
2.1.5.5	Přesrážení DNA ethanolem	26
2.1.5.6	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk čisté bakteriální kultury pomocí magnetických nosičů (testování různého pořadí komponent separační směsi).....	26
2.1.5.7	Izolace DNA pomocí magnetických nosičů (Optimalizace metody adsorpce DNA na magnetických mikročásticích)	27
2.1.5.8	Izolace purifikované DNA pomocí magnetických mikročástic (standardní postup) a stanovení koncentrace DNA a RNA	28
2.1.5.9	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk ze vzorku tvrdého sýra a tekutých mléčných výrobků pomocí magnetických mikročástic – standardní postup	29
2.1.5.10	Studium chování DNA ve vodném dvoufázovém systému kapalina-kapalina)	29
2.1.5.11	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup I	30
2.1.5.12	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup II	31
2.1.5.13	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup III	31
2.1.5.14	Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup IV	32
2.1.5.15	Gelová elektroforéza – detekce izolované DNA po separaci magnetickými mikročásticemi a po fenolové extrakci	32
2.1.5.16	Citlivost PCR pro rod <i>Lactobacillus</i>	32
2.1.5.17	Polymerázová řetězová reakce (PCR) – identifikace rodu <i>Lactobacillus</i>	33
2.1.5.18	Citlivost PCR pro druh <i>Bifidobacterium longum</i>	33
2.1.5.19	Polymerázová řetězová reakce (PCR) – identifikace druhu <i>Bifidobacterium longum</i> ve vzorcích tvrdého sýru	34
2.1.5.20	Citlivost PCR pro rod <i>Bifidobacterium</i>	34
2.1.5.21	Polymerázová řetězová reakce(PCR) – identifikace rodu <i>Bifidobacterium</i>	35
2.1.5.22	Gelová elektroforéza – detekce PCR produktu	35
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
3.1	STANOVENÍ KONCENTRACE BAKTERIÁLNÍ DNA PRO PŘÍPRAVU HMOTNOSTNÍCH STANDARDŮ	36
3.2	IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA POMOCÍ MAGNETICKÉ NOSIČE P(HEMA-CO-GMA) Z HRUBÝCH LYZÁTŮ BUNĚK S RŮZNÝM POŘADÍM KOMPONENT	36
3.2.1	<i>Magnetická separace a PCR</i>	36
3.3	OPTIMALIZACE METODY ADSORPCE DNA NA MAGNETICKÉ MIKROČÁSTICE	40
3.3.1	<i>Magnetická separace</i>	40
3.4	IZOLACE DNA Z BAKTERIÁLNÍ KULTURY <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> SSP. <i>PARACASEI</i>	41
3.4.1	<i>Magnetická separace a PCR</i>	41
3.5	IDENTIFIKACE RODU <i>LACTOBACILLUS</i> V TEKUTÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH	44
3.5.1	<i>Magnetická separace (standardní postup) a PCR</i>	44
3.6	IDENTIFIKACE RODU <i>LACTOBACILLUS</i> V TEKUTÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH	50
3.6.1	<i>Studium chování DNA ve dvoufázovém systému</i>	50
3.6.2	<i>Izolace DNA z tekutých mléčných výrobcích s následnou PCR</i>	53
3.7	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DRUHU <i>BIFIDOBACTERIUM LONGUM</i> VE VZORKU TVRDÉHO SÝRU	59
3.7.1	<i>Citlivost PCR</i>	59
3.7.2	<i>Izolace DNA a PCR</i>	60
3.7.3	<i>Identifikace rodu Bifidobacterium ve vzorku tvrdého sýru</i>	62

3.7.4	<i>Citlivost PCR</i>	62
3.7.5	<i>Provedení PCR</i>	63
4	ZÁVĚR	65
5	SEZNAM LITERATURY	66

1 Úvod

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je velmi rozšířenou molekulárně diagnostickou metodou. Při amplifikaci lze určitý fragment DNA pomnožit geometrickou řadou. Metoda je velmi citlivá a pro její úspěšný průběh stačí velice nízké množství DNA (v řádech fentogramy). S její citlivostí souvisí i značná senzitivita vůči látkám, které dokáží její průběh inhibovat. Tyto látky se běžně vyskytují v reálných vzorcích, ze kterých je DNA izolována. Proto je nutné získat DNA v dostatečné čistotě, aby mohla být amplifikace určitého fragmentu DNA provedena úspěšně.

K tomuto účelu lze s úspěchem použít reverzibilní imobilizace DNA na pevnou fázi (magnetický nosič), kdy za vhodných podmínek lze získat DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Pro navázání DNA na hydrofilní magnetické mikročástice je nutné navodit kondenzaci DNA. K tomuto jevu dochází v prostředí poly(ethylenglykolu) a nízkomolekulární soli (chloridu sodného).

Metoda magnetické separace se vyznačuje oproti standardním metodám (např. fenolová extrakce) snadnou manipulovatelností se vzorkem, časovou nenáročností a možností automatizace. Nepracuje se s toxickými látkami, jako jsou fenol a chloroform

2 Teoretická část

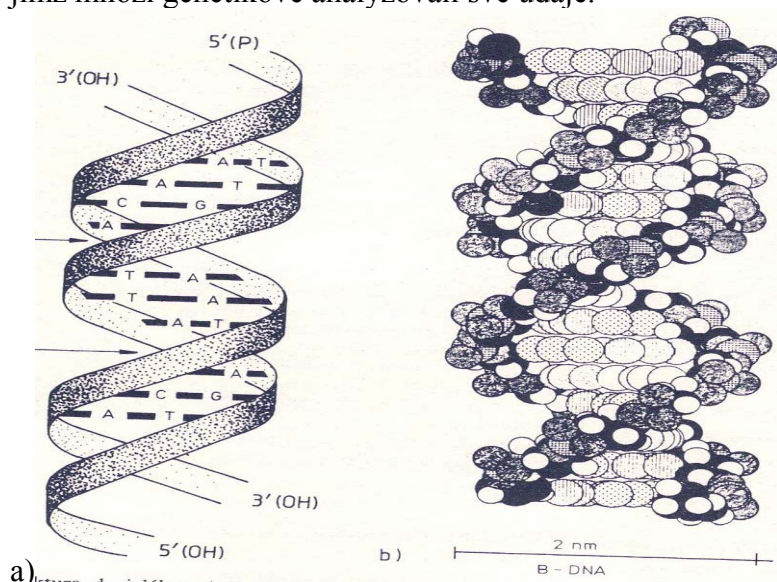
2.1 Nukleové kyseliny

Až do roku 1944 byl velmi malý počet pracovníků, kteří se zabývali studiem nukleových kyselin. Vědělo se, že existují dvě nukleové kyseliny: deoxyribonukleová (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA). Nebyly však objasněny obecné rysy jejich struktury a převažoval názor, že nejsou nositeli genetické informace. Pracovníci zabývající se touto problematikou se domnívali, že čtyři v ní se vyskytující typy nukleotidů jsou přítomné ve stejných množstvích a že DNA má repetitivní strukturu, podobně jako například glykogen.

Roku 1944 americký mikrobiolog Avery a jeho kolegové MacLeod a McCarty zjistili, že dědičné vlastnosti bakterií *Streptococcus pneumoniae* lze specificky měnit přidáním pečlivě izolované DNA o vysoké molekulové hmotnosti. To se dalo považovat za první skutečný důkaz o genetické úloze nukleových kyselin. Do této doby téměř všichni vědci domnívali, že geny jsou bílkoviny. [1]

2.1.1 DNA

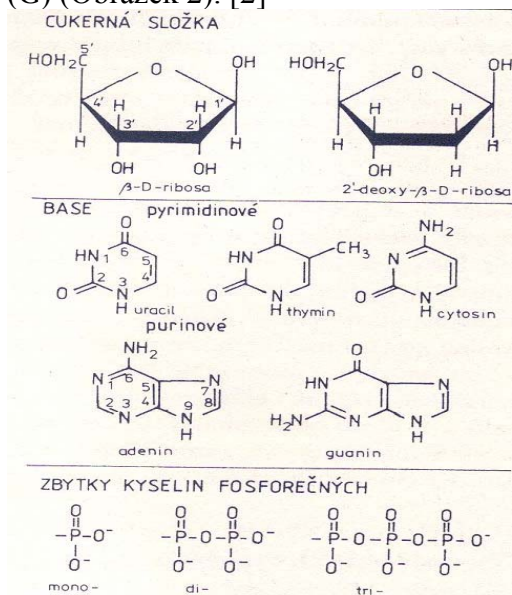
Při studiu chemické podstaty chromosomů bylo zjištěno, že DNA je v eukaryotních buňkách umístěna téměř výlučně v jádře a vždy v chromosomech. Do 50. let 20. století byla z hlediska struktury nukleových známá jen skutečnost, že se jedná o velmi dlouhou makromolekulu; míra její komplexity však nebyla jasná. Prvním zlomem v objasňování struktury DNA byla teorie vycházející z difrakce šroubovicových molekul publikovaná v roce 1951. Jejím autorem byl Pauling, který se zajímal o strukturu α -šroubovice. Tato teorie usnadnila testování možné struktury DNA. Správné řešení našli roku 1953 Crick a Watson (Obrázek 1). Objev dvoušroubovicové struktury DNA přinesl zásadní revoluci ve způsobu, jímž mnozí genetikové analyzovali své údaje.



Obrázek 1: Schéma dvoušroubovicové DNA. (a) Schéma uspořádání dvou polynukleotidových řetězců v dvoušroubovici s označením jejich konců. (b) Model výseku struktury B formy DNA. [2]

Zjištěním Watsona a Cricka bylo, že se DNA sestává ze dvou komplementárních, do sebe svinutých vláken. Vlákna jsou drženy pohromadě vodíkovými vazbami mezi páry purinových a pyrimidinových bází. Páry bází se nacházejí ve středu molekuly DNA. Nukleové báze mají plochou strukturu a jsou hydrofobní i když obsahují polární skupiny

C=O a NH₂. Přítomnost komplementárních párů bází v dvoušroubovicové DNA umožňuje existenci pravidelné struktury, protože všechny páry bází mají stejnou velikost. Průměr šroubovice je asi 2 nm a řetězec vytváří každých 3,4 nm jeden závit. Každý řetězec je polynukleotidem, v němž je cukerná složka každého nukleotidu připojena fosfátovou skupinou k nukleotidu sousednímu. [1] V každém závitě šroubovice se nachází 10 nukleotidů. Nukleotidy obsahují zbytek deoxyribosy, fosfátovou skupinu a purinovou nebo pyrimidinovou bázi. Pyrimidiny jsou thymin (T), cytosin (C) a puriny adenin (A) a guanin (G) (Obrázek 2). [2]



Obrázek 2: Struktura součástí nejdůležitějších nukleotidů. [2]

Adenin se vždy páruje s thyminem a guanin s cytosinem. Tato pravidla párování jsou velmi přísná a jejich důsledkem je skutečnost, že mezi sekvencemi bází u dvou do sebe zavlnutých řetězců existuje komplementarita. [2]

Na rozdíl od poměrů A/T a G/C, které musí být vždy rovny 1, aby bylo splněno pravidlo o párování, existují velké rozdíly v poměru obsahů $(A + T)/(G + C)$ u molekul DNA různého původu. Vyšší rostliny a živočichové mají ve své DNA více A+T než G+C, zatímco u virů, bakterií a nižších rostlin existuje v tomto ohledu větší variabilita a vyskytují se zde druhy bohaté na A+T i na G+C. Tyto rozdíly však nejsou čistě náhodné a poměry bází u taxonomicky příbuzných organismů jsou velmi podobné. Důvod širokého rozptylu poměrů bází doposud není znám. [1]

Molekuly s vysokým obsahem G+C jsou mnohem odolnější vůči účinkům zvýšené teploty (páry bází udržují totiž 3 vodíkové můstky) než molekuly bohaté na A+T (2 vodíkové můstky). Když se dvoušroubovicové molekuly DNA zahřívají na vyšší teplotu než 94 °C, vlákna se od sebe oddělují a dochází k denaturaci DNA. Pomalým ochlazením lze DNA denaturovat. [1]

Z komplementárního párování bází lze vyvodit, že jedno vlákno slouží jako specifická struktura (templát), na které se syntetizuje druhé vlákno. Na základě uvedeného modelu struktury DNA byl navržen mechanismus replikace DNA (viz. Kapitola 2.1.1.1).

2.1.1.1 Replikace DNA

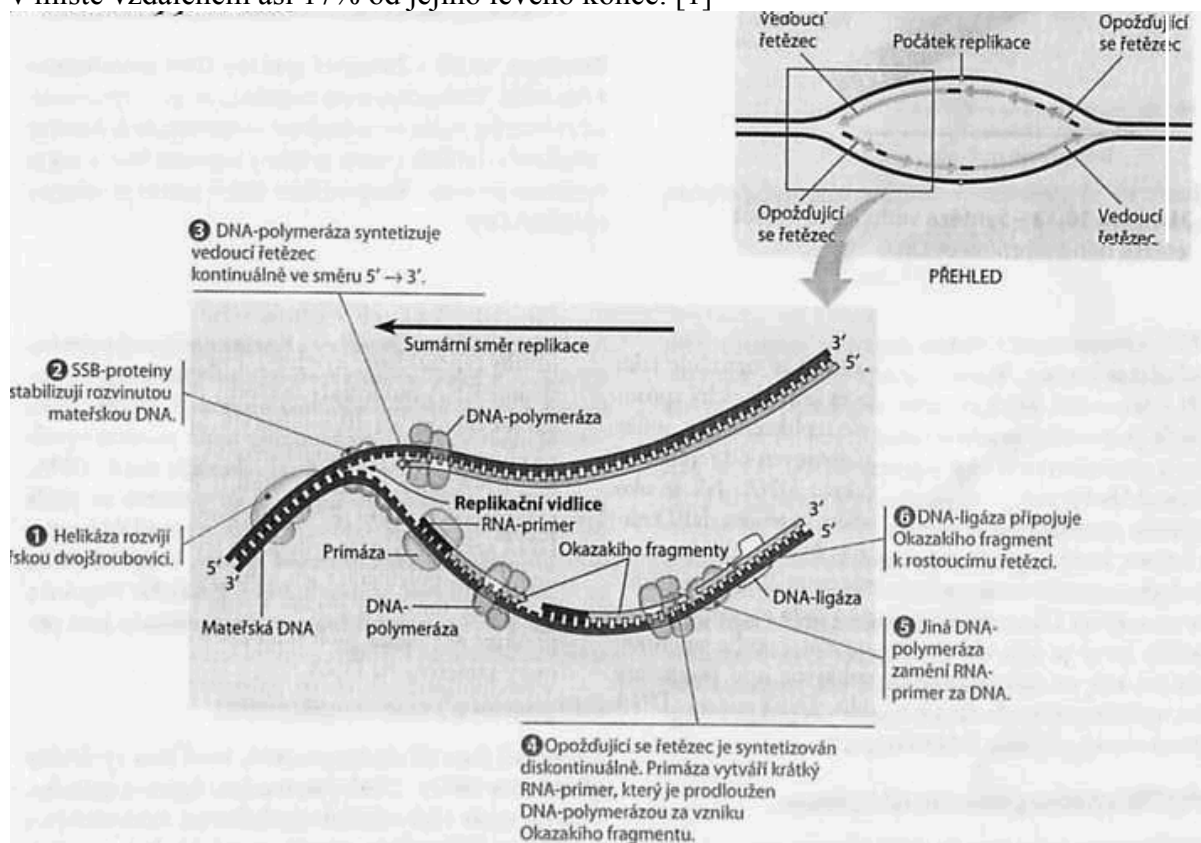
Watsonův a Crickův semikonzervativní model předpokládá, že při replikaci dvoušroubovice bude mít každá z dceřiných molekul jeden starý řetězec získaný z mateřské molekuly a jeden řetězec, který je vytvořený nově. Replikace DNA (viz. Obrázek 3) zahrnuje oddělování vláken a tvorbu komplementárních molekul na každém jednotlivém volném vlákně. Vodíkové můstky jsou poměrně slabé (průměrná energie je asi 17 kJ.mol⁻¹). K jejich

vytvoření či přerušení není zapotřebí žádných enzymů. Molekula DNA je velmi tenká (2 nm) a rotace kolem její osy nevyžaduje téměř žádnou energii. [1]

Enzymem, který katalyzuje syntézu nového řetězce je DNA-polymerasa. Replikace molekuly DNA (iniciace replikace) začíná na specifických místech nazývaných počátek replikace (primery, očka). Jde o úsek DNA se specifickou sekvencí nukleotidů. Bakteriální chromosom, který je kruhový, má je jeden počátek. Enzymy, které spouští replikaci, tuto sekvenci rozpoznají. Připojí se k DNA, rozdělí oba řetězce a otevřou replikační oko, které má obou koncích tvar replikační vidlice. Replikace DNA pak probíhá v obou směrech, dokud není celá molekula zkopírována. Enzym, který rozvíjí DNA v replikační vidlici, se nazývá helikasa. SSB-proteiny se pak seřadí podél oddělených DNA řetězců a udržují je od sebe, dokud slouží jako templaty pro syntézu nového řetězce. [3]

Rychlost syntézy nového řetězce (elongace) je u bakterií asi 500 nukleotidů za sekundu a více; u člověka 50 nukleotidů za sekundu. Zdrojem energie pro polymeraci nukleotidů jsou nukleosidtrifosfáty. DNA-polymerasa katalyzuje připojování nukleotidů ke 3'-konci již existujícího řetězce. Nový DNA řetězec se tedy může prodlužovat jen ve směru $5' \rightarrow 3'$. Takto vznikající řetězec může být syntetizován nepřetržitě. Tento řetězec je nazýván vedoucí. K jeho syntéze vyžaduje DNA-polymerasa jeden primer, který vytvoří enzym primasa. Primer je tvořen krátkým úsekem RNA (u eukaryot je dlouhý asi 10 nukleotidů). Později další DNA-polymerasa zamění RNA-nukleotidy za jejich DNA verzi.

Druhý řetězec je vytvářen diskontinuálně. Je vytvářen jako řada fragmentů, které se nazývají Okazakiho fragmenty (u eukaryot jsou fragmenty dlouhé asi 100 – 200 nukleotidů). Zde je nutné, aby každý nově vznikající fragment měl svůj primer, což řídí výše uvedený enzym primasa. Jednotlivé fragmenty jsou pak spojeny DNA-ligasou za vzniku jediného řetězce. Druhá polovina se syntetizuje jako opoždující řetězec. Replikace totiž nezačíná hned v začátku vidlice (Obrázek 3). [3] Bylo zjištěno, že replikace začíná uvnitř molekuly, a to v místě vzdáleném asi 17% od jejího levého konce. [1]



Obrázek 3: Replikace dvoušroubovicové DNA.

DNA-polymerasa se tedy pohybuje po templátu DNA ve směru nově vznikajícího řetězce. Během replikace dochází chybám, které jsou ale opravovány. Během replikace kontroluje sama DNA-polymerasa polohu každého nukleotidu vůči templátu, jakmile je připojen k rostoucímu řetězci. Někdy se chybné párování projeví až po replikaci, ale i v tomto okamžiku má buňka k reparaci enzym nukleasu, který chybnou část odstraní a DNA-polymerasa a ligasa prázdné místo vyplní.

Běžný replikační proces neumožňuje dokončit 5'-konce lineárních dceřiných DNA řetězců, který vzniká po enzymatickém odstranění primeru. V důsledku toho vznikají při opakované replikaci stále kratší a kratší molekuly DNA. Prokaryotická buňka se tomuto vyhnula tím, že jejich molekula DNA je kruhová, a tak vlastně nemá konec. Eukaryotické chromosomální molekuly DNA mají na svých koncích specifické sekvence nukleotidů nazývané telomery. Ty nenesou geny, místo toho je jejich DNA tvořena četnými repetitivy jedné krátké nukleotidové sekvence. Počet repetitiv na telomerických koncích se pohybuje okolo 100 až 1 000. Z dlouhodobého hlediska potřebují eukaryotické organismy v průběhu generací způsob obnovy svých zkrácených telomer. To umožňuje enzym telomerasa. Jedná se o enzym, který katalyzuje prodloužení telomer a je složen z krátké molekuly RNA a proteinu, RNA obsahuje nukleotidovou sekvenci, která slouží jako templát pro nové telomerické úseky na 3'-konci telomery. Je však ale zajímavé, že telomerasa se nevyskytuje ve všech buňkách mnohobuněčných organismů, včetně člověka, které byly kultivovány in vitro. DNA dělicích se somatických buněk má sklon být kratší u starších jedinců a buněk v kulturách, které se mnohokrát rozdělily. Je tedy možné, že telomery představují limitující faktor pro životnost určitých tkání a dokonce i organismu jako celku. [3]

Studováním replikace u *E. coli* bylo zjištěno, že se tohoto děje účastní 3 druhy DNA-polymerasy (I, II, III). DNA-polymerasa I spojuje deoxynukleosidtrifosfáty na matricích DNA, dále má schopnost po syntéze řetězce DNA tento řetězec zkontrolovat a opravit své chyby (tak vlastně působí jako 3'-5' exonukleasa), také má ale i 5'-3' nukleasovou aktivitu, která ve spojení s polymerasovou aktivitou může vytěšňovat mezeru v DNA. Bylo zjištěno, že DNA-polymerasa II má 3'-5' polymerasovou, 3'-5' exonukleasovou aktivitu. DNA-polymerasa III má 3'-5' polymerasovou, 3'-5' (plní úlohu primárního editoru při replikaci DNA) a 5'-3' exonukleasovou aktivitu (vztahuje se pouze na jednovláknovou DNA). Není schopna replikovat jednovláknovou DNA opatřenou primerem nebo přerušenou dvoušroubovicí DNA. In vitro působí Pol III v mezerách jediného vlákna menšího než 100 nukleotidů, což připomíná stav DNA v replikační vidlici. [4]

2.2 Charakteristika bakterií mléčného kvašení

Skupina bakterií mléčného kvašení zahrnuje grampozitivní, katalasa negativní, nesporulující tyčinky, koky až kokotyčinky, které zpracovávají cukry fermentativně. Homofermentativní druhy bakterií mléčného kvašení vytvářejí kyselinu mléčnou jako hlavní a jediný produkt metabolismu, na rozdíl od druhů heterofermentativních, které v průběhu metabolismu produkují vedle kyseliny mléčné i jiné látky. [5, 6]

Skupina bakterií mléčného kvašení původně zahrnovala rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Na základě nedávných výsledků taxonomických studií, které byly prováděny pomocí molekulárně biologických metod, byly do této skupiny přearovány další rody a to *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* a *Vagococcus*. [7] Fylogeneticky se bakterie mléčného kvašení řadí do klostridiální vývojové větve grampozitivních bakterií. Jejich DNA obsahuje méně než 55% G+C. [6]

Někteří autoři do skupiny bakterií mléčného kvašení řadí i rod *Bifidobacterium*, ačkoliv je tento rod fylogeneticky odlišný. Obsahuje více než 55% G+C v DNA, a proto je řazen do fylogenetické větve Aktinomycet. K bakteriím mléčného kvašení je řazen na základě produkce kyseliny mléčné. [6, 7]

2.2.1 Charakteristika rodu *Lactobacillus*

Druhy rodu *Lactobacillus* představují jeden z nejdůležitějších taxonů v potravinářské mikrobiologii s významnou úlohou v lidské výživě. Významné jsou také probiotické vlastnosti vykazované některými kmeny. Rod *Lactobacillus* patří mezi Gram-positivní, nesporulující mikroorganismy. Co se týče buněčného tvaru, mohou se vyskytovat ve tvaru jak tyčec, tak kokobacilů. Buď se nacházejí samostatně nebo tvoří řetízky; většinou jsou ale nepohyblivé. [8] Rod *Lactobacillus* je poměrně heterogenní skupinou bakterií, protože v DNA jsou velké rozdíly v obsahu cytosinu a guaninu (32 – 53 %). [7] Jsou striktně fermentující, mikroaerofilní, chemoorganotrofní a vyžadují bohatá růstová média. Jsou kataláza negativní, i když u některých kmenů může být přítomna pseudokatalázová aktivita. Fermentace může probíhat homofermentativně, kdy je hlavním produktem kyselina mléčná, ale také heterofermentativně, kdy se spolu s kyselinou mléčnou tvoří i jiné produkty (CO₂, ethanol, kyselina octová, mravenčí, atd.). [5, 6] Teplota optimální pro růst se nachází ve velmi širokém rozmezí 1 - 50 °C. U bakterií, jenž jsou využívány průmyslově pro fermentaci potravin, je optimum pro růst v rozmezí 25 - 40 °C. Některé druhy se účastní i spontánních fermentací a teplotní optimum mají 10 – 25 °C. [8] Pro většinu zástupců je optimální teplota kolem 37 °C a pH 6; jakmile klesne hodnota pH pod 4, růst většiny laktobacilů se zastavuje. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou acidotolerantní. [9] Produkty fermentace snižují pH prostředí na hodnoty 3,5 – 5 [8], což potlačuje růst patogenních bakterií.

2.2.1.1 Rozdělení rodu *Lactobacillus* z hlediska jejich metabolismu

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou schopné utilizovat laktosu, sacharosu, fruktosu, glukosu, galaktosu a některé druhy mohou fermentovat i pentosy. [8] Rod je rozdělen na základě fermentace do 3 skupin (Tabulka 1).

Tabulka 1: Rozdělení rodu *Lactobacillus* na základě typu fermentace [8]

Skupina	1	2	3
Fermentace	Obligátně homofermentativní	Fakultativně heterofermentativní	Obligátně heterofermentativní
Konečný produkt fermentace	kyselina mléčná	kyselina mléčná nebo kyselina octová a mravenčí, ethanol, oxid uhličitý	kyselina mléčná, ethanol, oxid uhličitý, kyselina octová
Fermentace pentos	-	+	+
Zástupci	<i>L. delbueckii</i> subsp. <i>delbueckii</i> (<i>bulgaricus</i> , <i>lactis</i>), <i>L. leichmannii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>helveticus</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>delbueckii</i> (<i>ramnosus</i> , <i>pseudoplantarum</i>), <i>plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>sake</i>	<i>L. fermentum</i> , <i>L. divergens</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. confusus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>L. reuteri</i>

- Zástupci skupiny 1 – mají aldolasu, nemají fosfoketolasu, a proto nejsou schopny využívat pentosy. [10]
- Zástupci skupiny 2 – produkují plyn při metabolismu glukonátu a neprodukují plyn při metabolismu glukosy. [6]
- Zástupci skupiny 3 – zkvašují hexosu přes pentosový cyklus. Jejich charakteristickou vlastností je produkce plynu při metabolismu glukosy.

V dříve publikovaných pracích o taxonomii mléčných bakterií bylo stanovení typu fermentace využíváno pro identifikace bakterií. V současné době se ukazuje, že typ fermentace není pro identifikační účely vhodný a přednost je dávana molekulárně biologickým metodám.

2.2.1.2 Význam a využití rodu *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* se běžně vyskytují na rostlinách, zelenině, obilí, v čerstvém i zpracovaném mléce, v čerstvých a fermentovaných masných výrobcích, v zaživacím traktu lidí, zvířat a ptáků a v jejich výkalech. Některé druhy bakterií mléčného kvašení jsou velmi významné při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (např. jogurty, podmáslí), masných výrobků (např. salámy, párky) a dalších potravin (např. nakládaná zelenina) a v neposlední řadě pro výrobu probiotik. [5]

V současné době jsou k identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* (stejně jako většiny ostatních bakterií) používají molekulárně biologické metody. Především polymerázová řetězová reakce a postupy na ní založené, restriční analýza a DNA/DNA hybridizace. Při PCR se využívá znalosti částečné nebo kompletní sekvence 16S rRNA genu nebo jiných specifických genů. Jednoznačnou identifikační metodou je DNA-DNA hybridizace a postupy na ní založené.

2.2.2 Charakteristika rodu *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou morfologicky podobné s některými druhy laktobacilů, dříve také byly k laktobacilům řazeny. Jedná se o nepohyblivé tyčinky proměnlivého tvaru a velikosti, které se vyskytují samostatně nebo v různě dlouhých řetězcích. [8] Nejčastěji formou jsou krátké zakřivené tyčinky s kyjovitým koncem nebo ve tvaru Y. Podle tohoto tvaru byl rod pojmenován, protože bifido znamená rozdělený do dvou částí. [9]

Jsou to anaerobní bakterie, ačkoliv některé druhy mohou tolerovat nízké koncentrace kyslíku. Optimální růstová teplota je 37-41 °C. [8] Nerostou při teplotě pod 20 °C a při teplotě nad 45 °C. Jsou acidotolerantní, optimální pH pro růst je 6,5-7. [12] Obvykle nerostou nad pH 8 a pod pH 4. [8]

Fermentují glukosu za tvorby kyseliny mléčné a kyseliny octové v poměru 2:3, neprodukují CO₂. Dále mohou fermentovat laktosu, galaktosu a některé pentosy. [8] Klíčovým enzymem v jejich metabolismu je fruktosa-6-fosfát fosfoketolasa, která štěpí fruktosa-6-fosfát na erytrosa-4-fosfát a acetylfosfát. [12] Přítomnost fruktosa-6-fosfát ketolasy je jedním z hlavních identifikačních znaků bifidobakterií.

2.2.2.1 Význam a využití rodu *Bifidobacterium*

Intestinální trakt lidí a zvířat je hlavní ekologická nika, ve které se zástupci rodu *Bifidobacterium* vyskytují: Dále jsou součástí vaginální mikroflóry člověka, vyskytují se v dutině ústní, ve střevech včel a jiného hmyzu a v odpadních vodách.

Tento rod je dominantní ve střevním traktu dětí (hlavně kojených – růst je stimulován složkami kaseinu, který je přítomný v mateřském mléce) a novorozenců, kde působí projektivně proti střevním patogenům a stimuluje imunitu. [6] Nejvíce zastoupenými druhy bifidobakterií v zaživacím traktu dospělých lidí jsou *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, u dětí *B. infantis* a *B. breve*. [18] Dále jsou v zaživacím traktu přítomny druhy *B. angulatum*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum*. [24] Bifidobakterie mají antagonistický účinek proti různým střevním patogenním mikroorganismům včetně *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Yersenia enterocolitica*. Mechanismu eliminace patogenních mikroorganismů je založen na snížení pH. Bifidobakterie produkují jako extracelulární produkty velké množství kyselin, a tím je pH snižováno vnějšího prostředí. [12]

Jako probiotika jsou používány hlavně *B. longum*, *bifidum* a *infantis*, které jsou přidávány do mléčných výrobků a probiotických přípravků. [6]

2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla vyvinuta Kary Mullisem a jeho spolupracovníky ze společnosti Cetus Corporation v Emeryville v Kalifornii. První článek o PCR byl publikován autory v roce 1986. V roce 1993 byla za tento objev udělena Nobelova cena. [21]

2.3.1.1 Princip PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje amplifikovat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech a pomnožení v buňkách (jedná se o klonování *in vitro*). K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA se hybridizují krátké syntetické oligonukleotidy s definovanou sekvencí bází (primery), od nichž probíhá syntéza nového řetězce DNA. Syntéza je katalyzována termostabilní DNA dependentní DNA-polymerasou. V reakčním prostředí (pufru) jsou přítomny deoxyribonukleotidy, které představují stavební kameny pro nově syntetizovanou DNA.

PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu:

- denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C),
- připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65 °C),
- syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerasy (65-75 °C). [14]

Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) syntetizuje až miliarda kopií vybraného úseku DNA. Přesné hodnoty teploty a doby trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat.

Přesnost a úspěšnost PCR při amplifikaci určitého genu nebo části sekvence genomové DNA je závislá na pečlivém návrhu obou primerů. Pro návrh specifických primerů je nezbytná znalost nukleotidové sekvence amplifikovaného genu. Dále je nutné při návrhu primerů pro standardní PCR brát v úvahu několik dalších důležitých pravidel, mezi která patří:

- délka je zpravidla 18 – 25 nukleotidů,
- obsah G+C 40% až 60%,
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry,
- teplota T_m primerů alespoň 50 °C,
- podobná teplota T_m u obou primerů,
- specifčnost primerů – na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa,
- absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě duplexů,
- absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek), které by mohly snižovat citlivost PCR,
- zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C na 3'-konci primerů pro zajištění přesné vazby na templát. [14]

Pro návrh primerů v analyzovaných oblastech sekvence DNA existuje řada počítačových programů, která zohledňují výše zmíněná pravidla. K syntéze DNA se používají termostabilní DNA-polymerasy izolované z termofilních mikroorganismů (např. *Taq* DNA-polymerasa z *Thermus aquaticus*), které jsou stabilní při teplotách, při kterých dochází k denaturaci DNA. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. [14]

Buňka má schopnost chybně začleněné báze odstraňovat opravnými mechanismy, avšak *Taq* DNA-polymerasám 3'-5' exonukleasová aktivita chybí a inkorporace nesprávné báze zpravidla vede k terminaci řetězce a současně i syntézy DNA. V současné době byly zavedeny do praktického použití termostabilní DNA-polymerasy disponující 3'-exonukleasovou aktivitou, které byly izolovány z různých druhů pyrokoků, např. DNA-

polymerasa *Pfu* z *Pyrococcus furiosus* nebo DNA-polymerasa *Pwo* z *Pyrococcus woesei*. Frekvence chyb je u těchto polymeras 2-6krát nižší než u *Taq* DNA-polymerasy. Jejich běžné použití je ale obtížné, protože jejich 3'-exonukleasová aktivita často způsobuje degradaci jednořetězcových primerů. DNA polymerasy s 3'-exonukleasovou aktivitou však našly úspěšné uplatnění v kombinaci s *Taq* DNA-polymerasou v modifikacích PCR určené pro amplifikaci dlouhých úseků DNA. [14]

Pro získání požadovaného produktu je důležitá koncentrace jednotlivých složek reakční směsi. Kromě *Taq* DNA-polymerasy a primerů obsahuje reakční směs jako kofaktor Mg^{2+} ionty, které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerasou. Jelikož ionty Mg^{2+} intereagují nejen s dNTP, ale i s primery, templátovou DNA, EDTA je třeba ve většině případů stanovit pro každou aplikaci optimální koncentraci iontů Mg^{2+} empiricky. Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakce může vést k chybám a vzniku nespecifických produktů. [14]

Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. Příliš vysoký počet cyklů významně zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů PCR. Pro PCR je důležitá úplná počáteční denaturace templátu a obvykle k tomuto účelu postačuje zahřátí směsi na 94-97 °C po dobu 2-5 min. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují, což vede k nespecifickému párování primerů („self-priming“) a falešným výsledkům. Protože *Taq* DNA-polymerasa má při 95 °C poločas stability 40 min, volí se pro následnou denaturaci ampliconů během reakce doba do 60 s. Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bází, délce oligonukleotidů a hodnotě T_m produktu. Teplota T_a se obvykle pohybuje v rozmezí 55-68 °C po dobu 30-60 s. Syntéza DNA probíhá zpravidla při 68-72°C po dobu 1 – 2 minut. *Taq* DNA-polymerasa při této teplotě syntetizuje DNA rychlostí cca 60 bází/s. [14]

Výsledným produktem PCR jsou amplicony – úseky DNA definované délky o velikosti obvykle sto až tisíc párů bází (bp), jejichž přítomnost se v reakční směsi prokazuje elektroforézou v agarosovém nebo polyakrylamidové gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (PCR v reálném čase). [14]

PCR je plně automatizovaný proces, který využívá termostabilní DNA-polymerasu. Avšak i termostabilní DNA-polymerasa katalyzuje prodlužování primerů při laboratorní teplotě, což může být příčinou chyb a vzniku nespecifických produktů, zejména při nízkých koncentracích templátové DNA. *Taq* DNA-polymerasa příležitostně zařazuje do nově syntetizovaných řetězců chybné (nekomplementární) nukleotidy. Z analýzy sekvencí klonovaných PCR produktů vyplývá, že pro *Taq* DNA-polymerasu začleňuje chybně 1 nukleotid na 4000 až 5000 bp. Frekvence těchto chyb *in vitro* je značně závislá na vyváženosti jednotlivých složek reakce, zejména koncentraci volným Mg^{2+} iontů, změnách pH reakčního pufru a vyváženosti koncentrace čtyřech dNTP. Buňka má schopnost chybně začleněné báze odstraňovat opravnými mechanismy. [14]

Reakční podmínky

PCR probíhá v termocykleru, což je zařízení, které zajišťuje optimální podmínky pro provádění PCR. U tohoto přístroje lze naprogramovat průběh celého procesu – počet požadovaných cyklů, teplotu jednotlivých kroků, dobu jejich trvání, apod. [16] Reakční směs bývá obvykle připravována v objemu od 25 do 100 µl. [17] **Reakční směs se skládá z těchto komponent:**

- **DNA templát** – slouží jako matrice pro syntézu nových řetězců DNA. Obsahuje cílová místa pro primery a do PCR může být přidáván v jedno nebo dvouřetězcové formě. Uzavřená kruhovitá DNA, která slouží jako templát, je amplifikována s trochu menší účinností než

lineární DNA. Obvyklá množství bakteriální a plazmidové DNA přidávané do reakce jsou 10 ng, 1 ng a 10 pg. [21]

- **Oligonukleotidové primery** – bývají synteticky připravené a jsou komplementární k DNA templátu, který má být amplifikován. [12] Teplota tání primerů bývá v rozmezí 55–80 °C. Pro její výpočet lze využít vzorec:

$$T_m (^\circ\text{C}) = 2 (\text{počet A} + \text{T}) + 4 (\text{počet G} + \text{C}) \quad [16]$$

Primery by neměly být mezi sebou komplementární, zejména ne na 3' konci, kde překrytí dvou nebo tří bází může způsobit vznik dimeru primerů, zejména při nadbytku primerů. Vyšší koncentrace může způsobit chybné nasedání primerů a tvorbu nespecifických PCR produktů. Naopak nízká koncentrace primerů může být příčinou malého výtěžku PCR produktu. [19]

- **DNA-polymerasa** – syntetizuje novou DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od místa navázání primeru až po jeho konec. [12] Doporučená koncentrace DNA-polymerasy (specifická aktivita 20 U/pmol) je 1 až 2,5 násobek na jednu 100 µl reakci. V jednotlivých případech je vhodné vyzkoušet širší škálu koncentrací (0,5 – 5 / 100 µl). Příliš nízká koncentrace způsobuje nedostatečnou tvorbu produktů a příliš vysoká koncentrace může zapříčinit syntézu nespecifických DNA fragmentů. [12]

- **3'- deoxynukleosid-5'- trifosfáty** – (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – stavební kameny pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200 µmol/l, toleranční rozpětí je 20 – 400 µmol/l. [20] Vysoké koncentrace dNTP (od 4 mmol/l a výše) působí inhibičně, protože vyvazují Mg^{2+} . [21] Nízké koncentrace mohou způsobit nízký výtěžek PCR produktu.

- **Mg^{2+} ionty** – tyto volné kationty jsou nezbytné pro aktivitu DNA-polymerasy. Koncentrace Mg^{2+} musí být optimalizována pro každou kombinaci primerů a templátů (množství Mg^{2+} závisí i na použité metodě izolace DNA). Obvykle se používá 1,5 mmol/l Mg^{2+} . Toleranční rozpětí je 0,5 – 8 mmol/l, vyšší koncentrace iontů snižuje specifitu. U primerů bohatých na G a C báze je ale použití vyšší koncentrace vhodnější. Nízká koncentrace může vést k inaktivaci polymerasy. [20, 21]

- **PCR pufr** – vytváří optimální prostředí pro DNA polymerasu. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3 – 8,8), 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl_2 . Případně může ještě obsahovat acetamid, albumin, želatinu nebo Tween – 20. [20, 21]

- **PCR voda** – používá se na doplnění PCR směsi na požadovaný objem. Nejvhodnější je voda o odporu 18 mΩ nebo voda pro injekce ČSL 4.

2.4 Elektroforéza

Jedná se o separační metodu, která je založena na migraci iontů, molekul, makromolekul nebo koloidních částic v elektrickém poli. Dělení může probíhat buď volně v roztoku (pufru) nebo ve vhodném nosiči. Rychlost pohybu resp. dráha, kterou za určitý čas molekula urazí, je přímo úměrná intenzitě vloženého elektrického pole resp. jeho potenciálovému spádu a celkovému náboji molekuly. Při elektroforéze v nosiči je výrazně potlačena rušivá konvekce, difúze je během elektroforézy omezena a po jejím skončení prakticky vyloučena. Jak nosiče se používají různé materiály (papír, acetát celulosy, silikagel, škrob, agarosa).

Při dělení se pak kromě elektrostatických sil uplatňuje i síťový efekt, takže mohou být rozděleny i látky se stejným efektivním nábojem, ale různou velikostí molekuly resp. molekulovou hmotností. Gely se prakticky připravují *in situ* v elektroforetických komorách. [27]

V našem případě byla gelová elektroforéza použita ke kontrole intaktnosti izolované DNA a k detekci PCR produktů (amplikonů).

2.5 Ultrafialová absorpční spektrometrie

Při této metodě je sledována absorpce záření v blízké ultrafialové oblasti (UV, 200-380 nm). Obsahem energie odpovídá toto záření přechodům mezi hladinami valenčních elektronů v molekule, obvykle mezi vazebnými, nevazebnými a protivazebnými orbitály

V našem případě byla pomocí metody UV spektrometrie stanovena koncentrace izolované DNA. Vycházelo se z Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log \frac{1}{T},$$

Kde je ε molární absorpční koeficient látky, c molární koncentrace, l délka optické dráhy a T je transmitance (propustnost). Oblast platnosti tohoto zákona se stanovuje měřením standardů. Při $A > 2$ je stanovení koncentrace vyloučeno, pro přesnější měření se obvykle požaduje $A < 1$. [27] Průběh spektra byl vyhodnocován při 4 vlnových délkách. První hodnotou bylo 235 nm. Při této vlnové délce absorbuje fenol, který může zůstat v roztoku po fenolové extrakci. Další hodnotou volené vlnové délky bylo 260 nm, což přibližně odpovídá absorpčnímu maximu nukleových kyselin. Hodnota změřené absorbance sloužila pro výpočet koncentrace DNA (hodnota $A = 1$ odpovídá koncentraci DNA 50 ng/μl). Další volenou hodnotou bylo 280 nm. Hodnota absorbance naměřené při této vlnové délce sloužila pro stanovení čistoty separované DNA, neboť při této vlnové délce absorbují proteiny. Čistota byla vypočtena z poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm:

$$\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}.$$

Hodnoty poměru větší než 2 znamenají, že se v roztoku nachází RNA. Hodnoty nižší než 1,8 znamenají, že vzorek obsahuje proteiny. Poslední hodnotou byla vlnová délka 310 nm, která byla vzata jako hodnota základní linie.

2.6 Ovlivňování průběhu PCR inhibitory

2.6.1 Falešně pozitivní výsledky

Vysoká citlivost a specifika PCR způsobuje, že kontaminace i jedinou molekulou exogenní DNA postačuje pro získání falešného signálu (falešně pozitivní výsledek). Pro minimalizaci falešně pozitivních výsledků byly doporučeny určité standardní postupy zahrnující používání autoklávaných roztoků, fyzikální separaci používaných PCR-reagencií od templátové DNA a produktů PCR, přípravu komponent i vzorků do alikvotních částí, používání UV-světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše, používání jednorázových rukavic, přidávání DNA do reakce jako poslední komponenty a pečlivou volbu pozitivních, negativních a vnitřních kontrol. Jako zdroj kontaminace je nejčastěji uváděn:

- přenos kontaminující DNA z dříve amplifikovaných produktů PCR,
- vzájemná kontaminace zdrojových materiálů,
- kontaminace vektorem z rekombinantního klonu, který obsahuje cílovou sekvenci.

V případě pochybností je nejlepším přístupem opakování experimentu s pečlivým dodržováním dílčích postupů a kontrol.

2.6.2. Falešně negativní výsledky

Při analýze čistých bakteriálních kultur je použití PCR zpravidla bezproblémové. Problémy nastávají při identifikaci bakterií v reálných vzorcích. Může docházet ke vzniku falešně negativních výsledků, které jsou způsobeny přítomností extracelulárních nebo intracelulárních inhibitorů PCR. [23] Falešně negativní výsledky v PCR mohou mít závažné důsledky na lidské zdraví (chybná diagnostika).

. K intracelulárním inhibitorům řadíme například endogenní nukleasy (u stafylokoků, salmonel, kampylobakterů), peptidy (u kampylobakterů), proteinasy, polysacharidy. Extracelulární inhibitory obecně zahrnují komponenty a reagenty vzorků, např. krev (hemoglobin, IgG), močovina, heparin, potraviny a jejich složky (Ca^{2+} v mléce, mléčné proteinasy, glykogen), složky životního prostředí (humínové kyseliny, těžké kovy), složky kultivačních medií (žlučové soli), detergenty, ionty, antibiotika, proteiny, minerální oleje a další. [25]

2.6.1.1 Mechanismus působení inhibitorů

Podle mechanismu inhibice rozdělujeme inhibitory do 3 skupin. Zařazení do těchto skupin není absolutní, protože inhibitory mohou působit více než jedním způsobem v závislosti na chemických, enzymatických a fyzikálních podmínkách reakce. [25]

Skupiny pro rozdělení inhibitorů PCR:

- *Inhibitory, které zabraňují dostatečně účinné lyzi buněk nutné k uvolnění DNA*

Základní podmínkou amplifikace DNA je, že dojde k lyzi buněk a uvolnění nukleových kyselin, které jsou dále amplifikovány. Porušení integrity buněčné stěny nemusí být dostatečné a tudíž nedojde k uvolnění DNA pro amplifikaci. Postupy lyze buněk jsou založeny na použití chemických, fyzikálních a enzymatických metod. Nedostatečná lyze buněk může nastat jak v důsledku nevhodně zvolených reakčních podmínek, tak i v důsledku inaktivace nebo nízké kvality lytických enzymů. Při práci s hrubými lyzáty buněk také někdy dochází k nedostatečnému oddělení uvolněné DNA od strukturálních proteinů a proteinů, které jsou navázány na DNA. Proteolytické enzymy a denaturační činidla, jež jsou obsaženy ve vzorcích, mohou degradovat enzymy, které jsou využívány pro lyzi buněk. Takto mohou rovněž reagovat fenolické látky obsažené ve vzorku nebo složky, které se dostanou do vzorku během purifikace DNA s organickými činidly. [25]

- *Inhibitory, jež degradují cílové nukleové kyseliny nebo primery, popřípadě obsazují jejich vazebná místa*

Degradace cílové DNA nebo primerů způsobuje falešně negativní výsledky. Degradace může nastat vlivem neenzymatické hydrolyzy, neenzymatické methylace, oxidačního poškození a enzymatické degradace. Nukleasy mohou vstoupit do reakce z vnějšího prostředí v důsledku neopatrné manipulace se vzorkem, mohou být přítomny v cílovém organismu nebo v ostatních bakteriích, přítomných ve vzorku. Bylo zjištěno, že stafylokoková termonukleasa je mimořádně teplotně odolná a je schopna hydrolyzovat genomovou DNA i primery během PCR i po ní. [25] Také byly studovány příčiny degradace PCR produktů při provádění PCR s nepurifikovanou DNA izolovanou z buněk bakterie *Salmonella*. V buňkách zjistili přítomnost termostabilních nukleas. Při uchovávání PCR produktů po amplifikaci DNA z hrubých lyzátů buněk při teplotě 4 °C postupně docházelo ke snížení intenzity amplikonů a po 48 hodinách nebyly na agarosovém gelu zjištěny žádné zřetelné pásy. Okamžité uchování vzorků po amplifikaci při -20 °C zřejmě inhibuje nukleasovou aktivitu. Také přidavek 60 mmol/l EDTA (pH 8,0) zabraňoval degradaci PCR produktů. Uvedený postup byl úspěšně používán při amplifikaci specifických sekvencí DNA bakterií rodu *Listeria* a *Lactococcus*. Amplifikovaná DNA z těchto organismů zůstávala nepoškozená i po skladování při 4 °C po dobu několika měsíců. Z uvedeného je zřejmé, že ne všechny bakterie mají termostabilní nukleasy, které jsou schopné odolávat teplotám, kterých bylo dosaženo během PCR. [13] DNAsová aktivita byla popsána i u *Campylobacter jejuni* Lior biotyp II (DNasa – pozitivní druhy). Inaktivace endogenní nukleasové aktivity bylo docíleno fixací bakteriálních buněk ve formaldehydu po dobu jedné hodiny. [15]

- *Inhibitory inaktivující termostabilní DNA-polymerasu*

Někteří autoři uvádějí jako příčinu inhibice PCR interferenci DNA s lytickými enzymy, které ovlivňují vazbu mezi cílovou DNA a polymerasou. Proto musí být ihned po buněčné lyzi

inaktivovány. Fenolické látky ze vzorků nebo zbytky fenolu po fenolové extrakci DNA mohou inhibovat reakci denaturací polymerasy. Proteinasy a denaturační činidla používaná pro buněčnou lyzi mohou být do PCR vzorku vneseny spolu s nedostatečně purifikovanou DNA. V jiných studiích byla inhibice amplifikace proteinasou eliminována přidáním proteinasového inhibitoru a bovinního sérového albuminu (BSA), který slouží jako alternativní substrát pro enzymatickou katalýzu. Sýrové proteiny rovněž inaktivují *Taq* polymerasu. Lze je odstranit pomocí extrakce horkým NaOH. Bakteriální proteasy a nukleasy, stejně jako degradační produkty buněk, žlučové kyseliny, soli žlučových kyselin a další faktory mohou zabránit amplifikaci (fyzikálně-chemická inhibice a enzymatická degradace). [25]

Dále byly porovnávány účinky známých látek, které inhibují PCR, na 9 komerčně dostupných termostabilních DNA-polymeras. Vzorky krve, sýrů, masa a výkalů, stejně jako rozdílné ionty, byly přidávány k PCR směsím, obsahujícím rozdílné termostabilní DNA polymerasy. Inhibice s *Taq* DNA-polymerasou komponenty biologických vzorků byla redukována nebo eliminována použitím jiné vhodnější termostabilní DNA-polymerasy. V současné době komerčně dostupné DNA-polymerasy vykazují rozdílné vlastnosti co se týče rezistence k rozdílným inhibičním složkám v klinických, enviromentálních a potravinových vzorcích. Výběrem vhodné polymerasy je možné účinněji amplifikovat nukleové kyseliny z určitého biologického materiálu bez nutnosti specifické úpravy vzorku před PCR. [11]

2.7 Bioseparace pomocí dvoufázového systému

Stále se zvyšující potřeby biochemie a biotechnologie vedou ke zvyšujícím se nárokům na separační a purifikační metody. Je žádoucí, aby byly separační metody rychlé a aby se nesnižovala účinnost separace. Mezi významné separační metody patří extrakce, kde dochází k rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze. Princip extrakce je primárně založen na chemických vlastnostech jednotlivých komponent, jako je hydrofobnost a hydrofilnost jednotlivých látek a jejich vzájemných interakcí. Dvoufázový vodný systém je alternativou tradičních extrakčních technik založených na rozdělování látek mezi organickou a vodnou fází. Je používán především při izolaci biomolekul, které je nutné izolovat v aktivní a nedenaturované formě. V těchto procesech patří mezi velmi nestabilní biomolekuly zejména proteiny, enzymy a nukleové kyseliny. [29, 30]

Vzájemnou nemísitelnost některých polymerů ve vodném roztoku poprvé popsal Beijerinck v roce 1896. Dvě fáze byly vytvořeny z agarů a rozpustného škrobu nebo želatiny. Tradiční dvoufázový systém používaný k bioseparaci jsou složeny ze dvou nemísitelných polymerů ve vodném roztoku, například PEG/NaCl, dextran/PEG. Jednotlivé fáze se formují při limitující koncentraci polymerů, která závisí na jejich charakteru, pH, teplotě roztoku, iontové síle intramolekulárních vazeb a molekulární váze jednotlivých polymerů. Převažují složkou obou fází. Obě fáze obsahují zejména vodu a to ze voda (70 – 90 %). Nemísitelnost jednotlivých fází je zejména přisuzována rozdílu hustoty vodných roztoků v jednotlivých fázích. Ve dvoufázovém systému tvoří horní fázi převážně poly(ethylenglykolu) (PEG). Tento jev je pravděpodobně způsoben hydrofobním prostředím a ethylenovými skupinami poly(ethylenglykolu).

Johansson a kol. studovali vliv různých iontů, pH a teploty na rozdělování proteinů v dvoufázovém systému. Pomocí solí, které přidával do systému, usměrňoval rozdělování jednotlivých hydrofobních proteinů. Dvoufázový systém je vhodný k separaci proteinů a enzymů z buněčného lyzátu a k minimalizaci škodlivých vlivů endogenních proteas. [28, 29]

Dvoufázový vodný systém byl rovněž s úspěchem použit k eliminaci vlivu inhibitorů PCR.

2.8 Adsorpce nukleových kyselin na pevné částice

Jak bylo uvedeno výše, při analýze reálných vzorků může docházet ke vzniku falešně negativních výsledků. Proto je při izolaci DNA z reálných vzorků zařazován další krok, jehož cílem je získání DNA v kvalitě vhodné pro PCR. K purifikaci DNA lze použít různé postupy, které se liší délkou izolačního postupu, použitými chemikáliemi, výtěžkem izolované DNA a její čistotou. Klasickým postupem je fenolová extrakce, která je však pracná, zdlouhavá a při práci se používají toxická rozpouštědla.

Jedním ze způsobů, jak odstranit vliv inhibitorů a poměrně rychle izolovat DNA z hrubých lyzátů buněk v kvalitě vhodné pro PCR je použití různých typů nosičů (ve formě částic nebo kolonek), přičemž je DNA reverzibilně adsorbována na povrch nosiče. Mezi přednosti uvedené techniky patří rychlost izolace, snadná a nenáročná manipulace a také odpadá práce s různými organickými rozpouštědly. Další výhodou je možnost automatizace. [26, 31]

K izolaci DNA lze s výhodou použít magnetických nosičů. Magnetické částice používané k izolaci DNA mají ve skutečnosti superparamagnetické vlastnosti, tzn. že vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Většinou nemají zbytkový magnetismus, a tudíž se bez přítomnosti vnějšího magnetického pole neshlukují a vytvářejí homogenní suspenzi. Ze vzorku lze nosiče odstranit pomocí magnetického separátoru. [22]

2.8.1 Aplikace magnetických částic pro separaci vysokomolekulární genomové DNA

Pro adsorpci DNA na magnetické částice s karboxylovými skupinami je nutné docílit kondenzace DNA (kulovitě-spirálovitý stav), aby bylo možné navázat DNA na záporně nabitě karboxylové skupiny, protože samotná DNA nese záporný náboj. Pro navození kondenzace je nutná přítomnost poly(ethylenglykolu). Tento jev byl popsán L. Lermanem a publikován v roce 1971. [33]

Vasilevskaya a spol. se zaměřili na určení kritické koncentrace a stupně polymerace PEG a koncentrace chloridu sodného pro dosažení kondenzace DNA. Zjistili, že kritická koncentrace PEG klesá se stupněm polymerace PEG a s koncentrací soli. [33] Uvedené poznatky o oblasti kritické koncentrace a stupně polymerace PEG byly potvrzeny v práci Kleideitera a Nordmeiera. Uvedení autoři zjistili, že DNA ve kulovitě-spirálovitém stavu je více stabilnější, když má PEG vyšší stupeň polymerace a když je i koncentrace soli vyšší. [32] Mechanismus adsorpce DNA, která se nachází v kondenzovaném stavu, na povrch nosiče není přesně znám.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Použité mikroorganismy a DNA pro optimalizaci

Pro optimalizace postupu adsorpce DNA byla použita sodná sůl DNA z kuřecích erytrocytů (Roanal, Budapešť, Maďarsko). Dále byla DNA izolována z bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 212/06, který byl získán ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (MILCOM, Tábor).

3.1.2 Chemikálie

3.1.2.1 Chemikálie

- Agarosa (Serva, Heidelberg, Německo)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, Německo)
- Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- MRS medium (de man, Rogosa, Sharp) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England)
- PCR vkladací pufr Yellow load (TopBio s.r.o., Praha, ČR)
- Poly(ethylenglykol), PEG 600; 6000; 8000 (Fluka, Buchs, Německo)
- Proteinasa K (Sigma, St. Louis, USA)
- Magnetické sklo (5 μm , CPG, N.Y., USA)
- Dále byly použity běžně dostupné chemikálie v kvalitě p.a.

3.1.2.2 Magnetické částice

V naší práci byly použity magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát (P(HEMA-*co*-GMA)) (1/1,w/w), které byly připraveny na Makromolekulárním ústavu Akademie věd ČR v Praze. Magnetické částice byly získány disperzní kopolymerací 2-hydroxymethakrylátu a glycidyl methakrylátu v prostředí toluenu/2-methylpropan-1-olu a kolidní olejové kyseliny, která pokrývala povrch magnetitu Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$), který tvoří magnetické jádro. Hydroxylové skupiny na povrchu mikročástic byly oxidovány 2 % vodným roztokem manganistanu draselného v kyselém prostředí (2 mol/l H_2SO_4) na karboxylové skupiny. Obsah karboxylových skupin byl 2,6 mmol/l $-\text{COOH}/\text{g}$. [31] Jako kontrola bylo použito magnetické sklo (2 mg/ml).

3.1.2.3 Komponenty a chemikálie pro PCR

- *Taq* DNA polymerasa Top Bio 1.1 (1 U/ μl) (Top Bio, Praha, ČR)
- DNA primery LbLMA1-rev, R16-1, BiLON 1, BiLON 2, Bif164, Bif662 byly syntetizovány firmou Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR
- DNA standard - 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerasu (10x koncentrovaný) (Top Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP (10 mmol/l) (Top Bio, Praha, ČR)
- Voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská Ľupča, Slovensko) (dále označována jako PCR voda)

3.1.3 Roztoky a media

3.1.3.1 Kultivační medium

- **MRS medium**

52 g M.R.S. bujóny bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody, Výsledné pH 6,2 bylo optimální pro kultivaci bakterií rodu *Lactobacillus*. Medium byl sterilizováno autoklávováním při teplotě 121 °C (100 kPa) po dobu 20 minut.

3.1.3.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů

(dle Španové a Ritticha 2002)

- **Roztok A**

10 mmol/l Tris.HCl (pH 7,8)

5 mmol/l EDTA (pH 8,0)

- **Roztok B**

10 mm Tris.HCl (pH 7,8)

5 mmol/l EDTA (pH 8,0)

LYSOZYM (3 MG/ML)

- **1 mol/l Tris.HCl**

TRIS BÁZE 12,1 G

1 mol/l HCl 11 ml

destilovaná voda 70 ml

Pomocí HCl byla pH upraveno na 7,8.

- **EDTA (0,5 mol/l, pH 8,0)**

202,23 g EDTA . 2 H₂O bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za stálého míchání na magnetické míchače, pH bylo upraveno pomocí 1 mol/l NaOH na hodnotu 8,0 a poté byl roztok doplněn na celkový objem 1000 ml.

3.1.3.3 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

(Podle Španové a Ritticha 2004, Učební texty laboratorních cvičení Speciální metody analýzy mikroorganismů T.; nepublikováno)

- **0,8 % agarosový gel**

agarosa 0,8 g

destilovaná voda do 100 ml

- **1,5% agarosový gel**

agarosa 1,5 g

destilovaná voda 100 ml

- **1,8 % agarosový gel**

agarosa 1,8 g
destilovaná voda do 100 ml

- **Ethidium bromid**

5 mg/ml (zásobní roztok se uchovává v tmavé nádobě). Barvicí roztok EtBr se ředí na koncentraci 0,5 µl/ml.

- **TBE pufr (5x koncentrovaný)**

Tris báze 54 g
Kyselina boritá 27,5 g
0,5 mol/l EDTA (pH 8,0) 20 ml

Zásobní roztok byl připraven smícháním uvedených komponent a doplněn destilovanou vodou na výsledný objem 1000 ml. Roztok byl přefiltrován. Tento zásobní roztok byl před použitím ředěn 10x destilovanou vodou.

3.1.3.4 Roztoky pro izolaci DNA

- 5 mol/l NaCl
- 40% PEG 600
- 40% PEG 6000

3.1.4 Přístroje a pomůcky

- Fotoaparát Polaroid DS 34 se žlutým filtrem (Polaroid, Cambridge, USA)
- Fotografie Polaroid 667
- Laboratorní váhy
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety
- Mikrovlnná trouba
- Minicentrifuga
- MiniCykler PTC-150TM (MJ Research)
- Spekol 1300 (Analytik Jena)
- Termocykler PTC – 200TM (MJ Research, Watertown, USA)
- Transiluminátor TVR-321A (Spectroline,)
- Zařízení pro elektroforézu
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Bio – Rad Typ 3000 XI 200/2.0 (Bio – Rad Lab., Richmond, USA)
- Quibit Fluorometer.
- Běžné laboratorní sklo, plastový materiál a pomůcky

3.1.5 Metody

Pokud není uvedeno jinak, tak byly popsány postupy prováděny dle Španové a Ritticha (2002): Učební texty laboratorních cvičení Speciální metody analýzy mikroorganismů I. Nepublikováno.

3.1.5.1 Příprava hrubých lyzátů z čisté bakteriální kultury

K bakteriální kultuře byl přidán 1 ml roztoku B, směs byla promíchána a ponechána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 50 µl 20% SDS a 5 µl proteinasy K (1 mg/ml). Ponechalo se inkubovat přes noc při 55 °C.

3.1.5.2 Izolace DNA z tekutých mléčných výrobků

Z tekutého mléčného výrobku bylo odebráno 2x 1 ml vzorku do dvou 1,5 ml mikrozkušavek. Vzorky byly centrifugovány (14 000 ot/5 min). Supernatant byl opatrně slit a sediment byl resuspendován a promyt v 1 ml sterilní vody a opět centrifugován za stejných podmínek. Pomytí bylo opakováno 5x. K sedimentu byl pak přidán 1 ml lyzačního roztoku B, ve kterém byl resuspendován. Následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi přidáno 50 µl 20% SDS a 5 µl proteinasy K (1 mg/ml). Vzorky byly pak inkubovány při 55 °C do druhého dne.

3.1.5.3 Izolace DNA ze vzorku tvrdého sýru

5 g vzorku bylo dokonale rozetřeno ve třecí misce v 10 ml sterilní vody. Směs byla přefiltrována přes sterilní gázu do zkumavky. Z filtrátu bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkušavky. Filtrát byly centrifugovány (14 000 ot/5 min). Supernatant byl opatrně slit a sediment byl resuspendován a promyt v 1 ml sterilní vody a opět centrifugován za stejných podmínek. Pomytí bylo opakováno 5x. Do mikrozkušavky byl přidán 1 ml lyzačního roztoku B ve kterém byl sediment resuspendován. Následovala inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi přidáno 50 µl 20 % SDS a 5 µl proteinasy K (1 mg/ml). Vzorky byly pak inkubovány při 55 °C do druhého dne.

3.1.5.4 Fenolová extrakce

K hrubému lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na 7,8). Směs byla kývavým pohybem opatrně promíchávána po dobu 4 minut. Poté následovala centrifugace (10 000 ot/3 min). Pomocí špičky s ustřiženým hrotem byla odebrána vodní fáze s DNA. Bylo nutno dbát, aby nebyla odebrána i proteinová mezivrstva. K vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 µl chloroform-*cis*-isoamylalkoholu (CIZ) a opět bylo opatrně promícháváno po dobu 4 min. Opět následovala centrifugace (10 000 ot./3 min). Vodní fáze byl odebrána do čisté mikrozkušavky.

3.1.5.5 Přesrážení DNA ethanolem

Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného. Směs byla promíchána.

Následně byl přidán 1 ml 96 % ethanolu. Obsah byl promíchán. DNA se nechala vysrážet při 20 °C. Poté byla směs centrifugována (15 000 ot/15 min). Supernatant byl opatrně slit, dále bylo pracováno se sedimentem. Ten byl sušen v exsikátoru (7 min a více). Následně byla DNA rozpuštěna v 500 µl TE pufru.

3.1.5.6 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk čisté bakteriální kultury pomocí magnetických nosičů (testování různého pořadí komponent separační směsi)

Bylo pracováno se šesti separačními směsmi, které jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Separací směsi s různým pořadím přidávání komponent

Pořadí komponent	Separační směs					
	1	2	3	4	5	6
1.	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
2.	5 mol/l NaCl	5 mol/l NaCl	40 % PEG	DNA	5 mol/l NaCl	5 mol/l NaCl
3.	DNA	DNA	DNA	40 % PEG	40 % PEG	MN
4.	40 % PEG	MN	MN	MN	MN	DNA
5.	MN	40 % PEG	5 mol/l NaCl	5 mol/l NaCl	DNA	40 % PEG

MN – magnetický nosič P(HEMA-*co*-GMA)

Po adsorpci byla DNA eluována TE pufrům a její množství detekováno pomocí gelové elektroforézy na agarose.

Sterilní destilovaná voda byla přidávána v množství 100 μl , 5 mol/l NaCl - 200 μl , 40 % PEG - 100 μl , vzorek DNA - 50 μl , magnetické částice - 50 μl . Celkový objem směsi byl 500 μl , tudíž výsledná koncentrace PEG byla 8 % a NaCl 2,5 mol/l.

Po smíchání komponent byla směs inkubována 15 minut při laboratorní teplotě, poté byla umístěna do magnetického separátoru (15 min) při laboratorní teplotě. Po uplynutí uvedené doby byl opatrně odebrán supernatant do mikrozkušavky a ty následně uchovány v lednici, než byla prováděna gelová elektroforéza. Do mikrozkušavek s částicemi, které byly ponechány v magnetickém separátoru, bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu. Ten byl po 2 minutách opatrně slit. Mikrozkušavky byly vyjmuty ze separátoru a umístěny do termostatu (teplota 50 $^{\circ}\text{C}$, doba 15 min – nutno dodržet a neprodlužovat), aby byl ethanol dokonale odpařen. Poté bylo DNA adsorbovaná na magnetických částicích eluována 50 μl TE pufru. Zvolená doba eluce byla 30 min. Po 30 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých mikrozkušavek.

3.1.5.7 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů (Optimalizace metody adsorpce DNA na magnetických mikročásticích)

Optimalizace metody izolace DNA byla prováděna s vysokomolekulární DNA z kuřecích erytrocytů. Její výchozí koncentrace byla 1 mg/ml. Izolace DNA probíhala pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA) a pro srovnání i pomocí magnetického skla o koncentracích 2 mg/ml. Při smíchávání separační směsi byla volena různá molekulová hmotnost PEG (600 a 6000 g.mol⁻¹) a různá výsledná koncentrace PEG (4, 8, 12, 16%) v separační směsi.

Separací směs byla připravována dle schématu uvedeného v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení separační směsi.

	Složka(μl)	PEG (% váh)			
		4	8	12	16
1.	H ₂ O	175	125	75	25
2.	NaCl	200	200	200	200
3.	DNA	25	25	25	25
4.	PEG (40%)	50	100	150	200
5.	Magnetický nosič	50	50	50	50

- Výsledný objem separační směsi 500 μl ,
- výsledná koncentrace P(HEMA-co-GMA) a magnetického skla byla 0,2 mg/ml,
- výsledná koncentrace DNA v separační směsi 49,9 ng/ μl ($A_{260\text{ nm}} = 0,998$),
- použitý PEG: 600 a 6000 g/mol,
- doba eluce z magnetických částic byla 30 minut,
- gelová elektroforéza prováděna na 0,8% agarosovém gelu, 60V/2 hod,
- provedeno 3x.

Po smíchání komponent byla směs inkubována 15 minut při laboratorní teplotě, poté byla umístěna do magnetického separátoru (15 min) při laboratorní teplotě. Po uplynutí uvedené doby byl opatrně odebrán supernatant do mikrozkušavky a ty následně uchovány v lednici, než byla prováděna gelová elektroforéza. Do mikrozkušavek s částicemi, které byly ponechány v magnetickém separátoru, bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu. Ten byl po 2 minutách opatrně slit. Mikrozkušavky byly vyjmuty ze separátoru a umístěny do termostatu (teplota 50 $^{\circ}\text{C}$, doba 15 min – nutno dodržet a neprodlužovat), aby byl ethanol dokonale odpařen. Poté bylo DNA adsorbovaná na magnetických částicích eluována 50 μl TE pufru. Zvolená doba eluce byla 30 min. Po 30 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých mikrozkušavek.

3.1.5.8 Izolace purifikované DNA pomocí magnetických mikročastic (standardní postup) a stanovení koncentrace DNA a RNA

DNA byla izolována fenolovou extrakcí z bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. Množství izolované DNA bylo 15,66 $\mu\text{l/ml}$. Následně byla DNA izolována pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA) a pro srovnání i pomocí magnetického skla o koncentracích 2 mg/ml. Při smíchávání separační směsi byla volena různá molekulová hmotnost PEG (600 a 6000 g.mol^{-1}) a různá výsledná koncentrace PEG (4, 8, 12 a 16%) v separační směsi. Složení separační směsi vystihuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Složení separační směsi.

	Složka(μl)	PEG (% váh)			
		4	8	12	16
1.	H ₂ O	300	200	100	-
2.	NaCl	400	400	400	400
3.	DNA	100	100	100	100
4.	PEG (40%)	100	200	300	400
5.	Magnetický nosič	100	100	100	100

- Výsledný objem separační směsi 1000 μl ,
- výsledná koncentrace P(HEMA-co-GMA) a magnetického skla byla 0,2 mg/ml,
- použitý PEG: 600 a 6000 g/mol,
- doba eluce z magnetických částic byla 30 minut,
- gelová elektroforéza prováděna na 0,8% agarosovém gelu, 60V/2 hod,
- provedeno 6x.

Po smíchání komponent byla směs inkubována 15 minut při laboratorní teplotě, poté byla umístěna do magnetického separátoru (15 min) při laboratorní teplotě. Po uplynutí uvedené doby byl opatrně odebrán supernatant do mikrozkuvek a ty byly následně uchovány v lednici, než byla prováděna gelová elektroforéza. Do mikrozkuvek s částicemi, které byly ponechány v magnetickém separátoru, bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu. Ten byl po 2 minutách opatrně slit. Mikrozkuvky byly vyjmuty ze separátoru a umístěny do termostatu (teplota 50 °C, doba 15 min – nutno dodržet a neprodlužovat), aby byl ethanol dokonale odpařen. Poté bylo DNA adsorbovaná na magnetických částicích eluována 50 μl TE pufru. Zvolená doba eluce byla 30 min. Po 30 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých mikrozkuvek.

Poté byla fluorimetricky stanovena koncentrace u všech získaných eluátů. Koncentrace byla měřena na přístroji Quibit Fluorometer. Všechny vzorky pro měření koncentrace byly pipetovány do průhledných sterilních mikrozkuvek, které byly součástí přístroje. Nejprve byl připraven pracovní roztok, který vznikl smícháním $n \times 199 \mu\text{l}$ roztoku Quant-iT Buffer (dodáno výrobcem) a $n \times 1 \mu\text{l}$ roztoku Quant-iT Reagent (dodáno výrobcem), kde n znamená počet vzorků. Poté byly připraveny standardy. První standard byl připraven smícháním 190 μl pracovního roztoku s 10 μl standardu 1, který obsahoval 0 ng/ml DNA a druhý standard byl připraven smícháním 190 μl pracovního roztoku a 10 μl Standardu 2, který obsahoval 10 ng/ μl DNA. Dále byla připravena série vzorků, která byla vytvořena smícháním 10 μl mého vzorku s DNA a 190 μl pracovního roztoku. Vzorky pro měření RNA byly připraveny stejným způsobem, jen pro přípravu standardů na měření RNA se použily jiné zásobní standardy.

Následně byly vzorky inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě. Poté byla provedena kalibrace přístroje. Nejprve byl vybrán program, zda měla být měřena koncentrace DNA, či

RNA. Pak byla do optické dráhy vložena mikrozkuhavka, jenž obsahovala standard 1, pak mikrozkuhavka se standardem 2. Po nakalibrování přístroje byly měřeny koncentrace DNA, nebo RNA ve vzorcích. Výpočet koncentrace byl podle vzorce:

$$\text{koncentrace} = QF \cdot \left(\frac{200}{N} \right), \text{ kde}$$

QF – hodnota naměřená flourometrem,

N - objem použitého vzorku.

3.1.5.9 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk ze vzorku tvrdého sýra a tekutých mléčných výrobků pomocí magnetických mikročástic – standardní postup

DNA byla izolována pomocí magnetického skla a magnetických částic P(HEMA-co-GMA) o koncentracích 2 mg/ml. Při smíchávání separační směsi byla volena různá molekulová hmotnost PEG (600 a 6000 g.mol⁻¹) a různá výsledná koncentrace PEG (8 a 16%) v separační směsi. Jednotlivé komponenty a jejich množství jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Složení separační směsi

	Složka (μl)	PEG (% váh)	
		8	16
1.	H ₂ O	100	-
2.	5 mol/l NaCl	200	200
3.	DNA	50	50
4.	PEG (40%)	100	200
5.	Magnetický nosič	50	50

- Výsledný objem separační směsi 500 μl,
- výsledná koncentrace P(HEMA-co-GMA) a magnetického skla byla 0,2 mg/ml,
- prováděno 6x.

Po smíchání komponent byla směs inkubována 15 minut při laboratorní teplotě, poté byla umístěna do magnetického separátoru (15 min) při laboratorní teplotě. Po uplynutí uvedené doby byl opatrně odebrán supernatant do mikrozkuhavky a ty byly následně uchovány v lednici, než byla prováděna gelová elektroforéza. Do mikrozkuhovek s částicemi, které byly ponechány v magnetickém separátoru, bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu. Ten byl po 2 minutách opatrně slit. Mikrozkuhavky byly vyjmuty ze separátoru a umístěny do termostatu (teplota 50 °C, doba 15 min – nutno dodržet a neprodlužovat), aby byl ethanol dokonale odpařen. Poté bylo DNA adsorbovaná na magnetických částicích eluována 50 μl TE pufru. Zvolená doba eluce byla 30 min. Po 30 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých mikrozkuhovek.

3.1.5.10 Studium chování DNA ve vodném dvoufázovém systému (kapalina-kapalina)

Pro vytvoření vodného dvoufázového systému (kapalina-kapalina) byl použit NaCl o výsledné koncentraci 3,52%, (NH₄)₂SO₄ o různých výsledných koncentracích a PEG (600, 6000 g/mol). Nejprve bylo studium provedeno s DNA z kuřecích erytrocytů o koncentraci 1 mg/ml a následně byl pokus proveden s DNA bakteriálního kmene *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCM 211/06 o koncentraci 485 ng/ μl. Všechny přidávané komponenty vystihuje Tabulka 6.

Tabulka 6: Množství komponent v separační směsi.

	Složka (μl)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)			
		6,13	9,95	13,76	17,57
1.	H_2O	172,25	131,5	90,75	50
2.	NaCl	72,25	72,25	72,25	72,25
3.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	65,5	106,25	147	187,75
4.	PEG (40%)	240	240	240	240
5.	DNA	50	50	50	50

- Výsledný objem 600 μl ,
- výsledná koncentrace 4,25 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ byla 6,13%; 9,95%; 13,76%; 17,57%,
- výsledná koncentrace 5 mol/l NaCl byla 3,52%,
- výsledná koncentrace PEG byla 16 %.

Po přidání všech komponent byla směs promíchána a následně se nechaly oddělit obě fáze. Z každé fáze bylo následně odebráno 10 μl pro gelovou elektroforézu, která byla provedena dle kapitoly 3.1.5.13 bez přípravy hmotnostních standardů.

3.1.5.11 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup I

DNA byla izolována pomocí magnetického skla a magnetických mikročástic P(HEMA-*co*-GMA) o koncentracích 2 mg/ml. Při smíchávání separační směsi byl vytvořen dvoufázový systém kapalina-kapalina. Systém byl vytvořen za použití složek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /PEG. Byla volena různá molekulová hmotnost PEG (600, 6000, 8000 g.mol⁻¹) o výsledné koncentraci 16% a různá výsledná koncentrace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve směsi (13,76%hm., 17,57%hm.). Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce 7.

Tabulka 7: Složení separační směsi

	Složka (μl)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
		13,76	17,57
1.	H_2O	40,75	-
2.	5 mol/l NaCl	72,25	72,25
3.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	147	187,75
4.	DNA	50	50
5.	PEG (40%)	240	240
6.	MN	50	50

- Výsledný objem separační směsi 600 μl ,
- výsledná koncentrace P(HEMA-*co*-GMA) a magnetického skla byla 0,17 mg/ml,
- výsledná koncentrace NaCl byla 3,52%hm.,
- prováděno 6x.

Jakmile byla směs připravena, tak byly obě fáze promíchávány 15 min, po této době byly mikrozkuhavky umístěny do magnetického separátoru (15 min). Následně byl odebrán supernatant. Do mikrozkuhovek s částicemi, které byly ponechány v magnetickém separátoru, bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu. Ten byl po 2 minutách opatrně slit. Mikrozkuhavky byly vyjmuty ze separátoru a umístěny do termostatu (teplota 50 °C, doba 15 min – nutno dodržet a neprodlužovat), aby byl ethanol dokonale odpařen. Poté bylo DNA adsorbovaná na magnetických částicích eluována 50 μl TE pufru. Zvolená doba eluce byla 30 min. Po 30 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých mikrozkuhovek.

3.1.5.12 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup II

Při smíchávání separační směsi byl vytvořen dvoufázový systém kapalina-kapalina. Systém byl vytvořen za použití složek NaCl/(NH₄)₂SO₄/PEG. Byla volena různá molekulová hmotnost PEG (600, 6000, 8000 g.mol⁻¹) o výsledné koncentraci 16%, různá výsledná koncentrace (NH₄)₂SO₄ ve směsi (13,76%hm., 17,57%hm.). Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce 8. Při aplikaci této metody byla odebrána horní fáze, kde byly zachyceny inhibitory PCR. DNA byla izolována ze spodní fáze pomocí magnetického skla a magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA) o koncentracích 2 mg/ml, které byly přidány až po odebrání horní fáze.

Tabulka 8: Složení separační směsi

	Složka (μl)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	
		13,76	17,57
1.	H ₂ O	40,75	-
2.	5 mol/l NaCl	72,25	72,25
3.	(NH ₄) ₂ SO ₄)	147	187,75
4.	DNA	50	50
5.	PEG (40%)	240	240
6.	MN	50	50

- Výsledný objem separační směsi 600 μl,
- výsledná koncentrace NaCl byla 3,52%hm.,
- prováděno 6x.

Směs byla připravena smícháním prvních pěti komponent. Pro dokonalé oddělení obou fází byla směs pouze promíchána jediným kývavým pohybem. Následně byla dokonale odebrána horní fáze a ke spodní fázi byly přidány magnetické mikročástice. Následně probíhalo míchání (15 min), pak byla směs umístěna do magnetického separátoru (15 min). Do mikrozkuvek s částicemi, které byly ponechány v magnetickém separátoru, bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu. Ten byl po 2 minutách opatrně slit. Mikrozkuvky byly vyjmuty ze separátoru a umístěny do termostatu (teplota 50 °C, doba 15 min – nutno dodržet a neprodlužovat), aby byl ethanol dokonale odpařen. Poté bylo DNA adsorbovaná na magnetických částicích eluována 50 μl TE pufru. Zvolená doba eluce byla 30 min. Po 30 minutách byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát byl odebrán do čistých mikrozkuvek.

3.1.5.13 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup III

Tato metoda byla prováděna stejně jako Postup I (kapitola 3.1.5.11), ale rozdíl byl pouze v tom, že do separační směsi nebyl přidáván 5 mol/l NaCl. Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce 9.

Tabulka 9: Složení separační směsi.

	Složka (μl)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	
		13,76	17,57
1.	H ₂ O	113	72,25
2.	(NH ₄) ₂ SO ₄	147	187,75
3.	DNA	50	50
4.	PEG (40%)	240	240
5.	MN	50	50

MN – magnetický nosič

3.1.5.14 Izolace DNA z hrubého lyzátu buněk z tekutých mléčných výrobků s použitím dvoufázového systému a magnetických částic – Postup IV

Tato metoda byla prováděna stejně jako Postup II (kapitola 3.1.5.12), ale rozdíl byl pouze v tom, že do separační směsi nebyl přidáván 5 mol/l NaCl. Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10: Složení separační směsi.

	Složka (μl)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	
		13,76	17,57
1.	H ₂ O	113	72,25
2.	(NH ₄) ₂ SO ₄	147	187,75
3.	DNA	50	50
4.	PEG (40%)	240	240
5.	MN	50	50

3.1.5.15 Gelová elektroforéza – detekce izolované DNA po separaci magnetickými mikročásticemi a po fenolové extrakci

Gelová elektroforéza byla provedena na 0,8% agarosovém gelu. Podmínky vedení byly 60 V/ 2 h, 0,5x TBE pufr. Na gely byly nanášeny hmotnostní standardy (1, 3, 5, 7 μl), vzorky separované DNA (10 μl) a supernatanty (10 μl). Celkový objem nanášený do komůrek byl 18 μl. K objemu DNA byly přidány 3 μl PCR vkladacího pufru a zbytek do 18 μl byl doplněn TE pufrem.

3.1.5.16 Citlivost PCR pro rod *Lactobacillus*

Jako DNA matrice posloužila DNA kmene *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCM 211/06. Bylo připraveno 6 vzorků s různou koncentrací, které byly 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl, 100 fg/μl a 10 fg/μl.

Při PCR byl amplifikován fragment DNA o délce 250 bp pomocí rodově specifických primerů LBLMA 1 a R16 – 1 (*Dubernet S., Desmaures N., Guéguen M.* (2002): A PCR – based Method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiology Letters 214: 271-275) specifických pro rod *Lactobacillus*.

Bylo připraveno 25 μl PCR směsi v tomto pořadí:

1. 19 μl vody pro PCR
2. 2,5 μl 10x reakčního pufru kompletního
3. 0,5 μl směsi dNTP (10 mM)
4. 0,5 μl primeru LbLMA 1 (10 pmol/μl)
5. 0,5 μl primeru R 16 – 1 (10 pmol/μl)
6. 1 μl DNA polymerasy Top Bio 1.1 (1U/μl)
7. 1 μl DNA matrice

Negativní kontrola byla připravena přidáním 1 μl PCR vody místo 1 μl DNA.

Vzorky byly opatrně promíchány a umístěny do cyklátoru, který byl naprogramován pro amplifikaci DNA rodu *Lactobacillus* – LBC ROD:

1. krok – denaturace (95 °C/30 s)
2. krok – připojení primerů (55 °C/30 s)
3. krok – syntéza DNA (72 °C/60 s)

Kroky se opakovaly celkem 30x. Před prvním krokem byla provedena denaturace 95 °C/5 min. Po skončení amplifikace byl vzorek ochlazen na 10 °C, což sloužilo ke krátkému uchování PCR produktů.

3.1.5.17 Polymerázová řetězová reakce (PCR) – identifikace rodu *Lactobacillus*

Program, podle kterého probíhala PCR, byl LBC ROD.

Bylo připraveno 25 µl PCR směsi v tomto pořadí:

1. 19 µl (pokud bylo pracováno s DNA pocházející z čisté bakteriální kultury), nebo 15 µl (pokud byla prováděna identifikace rodu *Lactobacillus* v mléčných výrobcích) vody pro PCR
2. 2,5 µl 10x reakčního pufru kompletního
3. 0,5 µl směsi dNTP (10 mM)
4. 0,5 µl primeru LbLMA 1 (10 pmol/µl)
5. 0,5 µl primeru R 16 – 1 (10 pmol/µl)
6. 1 µl DNA polymerasy Top Bio 1.1 (1U/µl)
7. 1 µl DNA matrice (pokud bylo pracováno s DNA pocházející z čisté bakteriální kultury), nebo 5 µl DNA matrice (pokud byla prováděna identifikace rodu *Lactobacillus* v mléčných výrobcích).

Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola, kdy byl použit 1 µl DNA matrice, jež pocházela z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* a negativní kontrola (místo 1 µl DNA byl přidán 1 µl PCR vody).

Vzorky byly opatrně promíchány a umístěny do cyklátoru, který byl naprogramován pro amplifikaci DNA rodu *Lactobacillus* – LBC ROD:

1. krok – denaturace (95 °C/30 s)
2. krok – připojení primerů (55 °C/30 s)
3. krok – syntéza DNA (72 °C/60 s).

Kroky se opakovaly celkem 30x. Před prvním krokem byla provedena denaturace 95 °C/5 min. Po skončení amplifikace byl vzorek ochlazen na 10 °C, což sloužilo ke krátkému uchování PCR produktů.

3.1.5.18 Citlivost PCR pro druh *Bifidobacterium longum*

Jako DNA matrice posloužila DNA druhu *Bifidobacterium longum* CCM 3746. Bylo připraveno 6 vzorků s různou koncentrací, které byly 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 100 fg/µl a 10 fg/µl.

PCR byla prováděna za použití sady druhově specifických primerů (Matsuki a kol., 1999) byl amplifikován fragment délky 831 bp. Dvěma použitými primery tedy byly BiLON-1 (sekvence báží 5'TTCCAGTTGATCGCATGGTC3') a BiLON-2 (sekvence báží 5'CGAAGGCTTGCTCCCAGT3').

Bylo připraveno 25 µl PCR směsi v tomto pořadí:

1. 19 µl vody pro PCR
2. 2,5 µl 10x reakčního pufru kompletního
3. 0,5 µl směsi dNTP (10 mmol/l)
4. 0,5 µl primeru BiLON-1 (10 pmol/µl)
5. 0,5 µl primeru BiLON-2 (10 pmol/µl)
6. 1 µl DNA polymerasy Top Bio 1.1 (1U/µl)
7. 1 µl DNA matrice

Negativní kontrola - místo 1 µl DNA byl přidán 1 µl PCR vody.

Vzorky byly opatrně promíchány a umístěny do cyklátoru, který byl naprogramován pro amplifikaci fragmentu DNA druhu *Bifidobacterium longum* – program MATSUKI (Matsuki a kol., 1999 – Blanka Krulová):

1. krok – denaturace (94 °C/20 s)
2. krok – připojení primerů (55 °C/20 s)
3. krok – syntéza DNA (72 °C/30 s)

Kroky se opakovaly celkem 35x. Před prvním krokem byla provedena denaturace 95 °C/5 min. Poslední krok syntézy byl 72 °C/5 min. Po skončení amplifikace byl vzorek ochlazen na 10 °C, což sloužilo ke krátkému uchování PCR produktů.

3.1.5.19 Polymerázová řetězová reakce (PCR) – identifikace druhu *Bifidobacterium longum* ve vzorcích tvrdého sýru

Program, podle kterého probíhala PCR, byl MATSUKI.

Bylo připraveno 25 µl PCR směsi v tomto pořadí:

1. 17 µl vody pro PCR
2. 2,5 µl 10x reakčního pufru kompletního
3. 0,5 µl směsi dNTP (10 mM)
4. 0,5 µl primeru BiLON-1 (10 pmol/µl)
5. 0,5 µl primeru BiLON-2 (10 pmol/µl)
6. 1 µl DNA polymerasy Top Bio 1.1 (1U/µl)
7. 3 µl DNA matrice

Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola, kdy byl použit 1 µl DNA matrice, jež pocházela z čisté bakteriální kultury *Bifidobacterium longum* CCM 3764, a tím pádem byl objem PCR vody 19 µl. Negativní kontrola - místo 1 µl DNA byl přidán 1 µl PCR vody.

Vzorky byly opatrně promíchány a umístěny do cyklátoru, který byl naprogramován pro amplifikaci fragmentu DNA druhu *Bifidobacterium longum* – program MATSUKI (Matsuki a kol., 1999):

1. krok – denaturace (94 °C/20 s)
2. krok – připojení primerů (55 °C/20 s)
3. krok – syntéza DNA (72 °C/30 s)

Kroky se opakovaly celkem 35x. Před prvním krokem byla provedena denaturace 95 °C/5 min. Poslední krok syntézy byl 72 °C/5 min. Po skončení amplifikace byl vzorek ochlazen na 10 °C, což sloužilo ke krátkému uchování PCR produktů.

3.1.5.20 Citlivost PCR pro rod *Bifidobacterium*

Jako DNA matrice posloužila DNA druhu *Bifidobacterium longum* CCM 3746. Bylo připraveno 6 vzorků s různou koncentrací, které byly 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 100 fg/µl a 10 fg/µl.

Pomocí PCR za použití rodově specifických primerů byl amplifikován fragment 523 bp. Dvěma použitými primery byly Bif164 (sekvence bází GGGTGGTAATGCCGGATG) a Bif662 (sekvence bází CCACCGTTACCGGGAA) (Matsuki a kol., 1999).

Bylo připraveno 25 µl PCR směsi v tomto pořadí:

1. 19 µl vody pro PCR
2. 2,5 µl 10x reakčního pufru kompletního
3. 0,5 µl směsi dNTP (10 mM)
4. 0,5 µl primeru Bif164 (10 pmol/µl)
5. 0,5 µl primeru Bif662 (10 pmol/µl)
6. 1 µl DNA polymerasy Top Bio 1.1 (1U/µl)
7. 1 µl DNA matrice

Negativní kontrola - místo 1 µl DNA byl přidán 1 µl PCR vody.

Vzorky byly opatrně promíchány a umístěny do cyklátoru, který byl naprogramován pro amplifikaci fragmentu DNA rodu *Bifidobacterium* – program KOK (Kok a kol. 1996):

1. krok – denaturace (94 °C/5 min)
2. krok – připojení primerů (55 °C/1 min)
3. krok – syntéza DNA (72 °C/2 min)

Kroky se opakovaly celkem 35x. Před prvním krokem byla provedena denaturace 94 °C/5 min. Poslední krok syntézy byl 72 °C/5 min. Po skončení amplifikace byl vzorek ochlazen na 10 °C, což sloužilo ke krátkému uchování PCR produktů.

3.1.5.21 Polymerázová řetězová reakce(PCR) – identifikace rodu *Bifidobacterium*

Program, podle kterého probíhala PCR, byl KOK.

Bylo připraveno 25 µl PCR směsi v tomto pořadí:

1. 17 µl vody pro PCR
2. 2,5 µl 10x reakčního pufru kompletního
3. 0,5 µl směsi dNTP (10 mM)
4. 0,5 µl primeru Bif164 (10 pmol/µl)
5. 0,5 µl primeru Bif662 (10 pmol/µl)
6. 1 µl DNA polymerasy Top Bio 1.1 (1U/µl)
7. 3 µl DNA matrice

Stejným postupem byla připravena pozitivní kontrola, kdy byl použit 1 µl DNA matrice, jenž pocházela z čisté bakteriální kultury *Bifidobacterium longum* CCM 3764, a tím pádem byl objem PCR vody 19 µl. Negativní kontrola - místo 1 µl DNA byl přidán 1 µl PCR vody.

Vzorky byly opatrně promíchány a umístěny do cyklátoru, který byl naprogramován pro amplifikaci fragmentu DNA rodu *Bifidobacterium* – program KOK (Kok a kol. 1996):

1. krok – denaturace (94 °C/5 min)
2. krok – připojení primerů (55 °C/1 min)
3. krok – syntéza DNA (72 °C/2 min)

Kroky se opakovaly celkem 35x. Před prvním krokem byla provedena denaturace 94 °C/5 min. Poslední krok syntézy byl 72 °C/5 min. Po skončení amplifikace byl vzorek ochlazen na 10 °C, což sloužilo ke krátkému uchování PCR produktů.

3.1.5.22 Gelová elektroforéza – detekce PCR produktu

Byl připraven 1,8 % (pro 250 bp), nebo 1,5 % (pro 831 bp) agarosový gel. Ke vzorků po PCR bylo přidáno 5 µl PCR vkladacího pufru a následně byly vzorky nanесeny do komůrek. Dále byla na gel nanесena negativní kontrola, pozitivní kontrola a DNA standard 100 bp žebříček. Podmínky provedení elektroforézy byly 50 V/3 h, 0,5x TBE pufr. Pak následovala detekce pod DNA v UV světle po hodinovém barvení v 500 ml ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µl/ml.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení koncentrace bakteriální DNA pro přípravu hmotnostních standardů

Bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA, která byla použita k přípravě hmotnostního standardu při gelové elektroforéze. Z absorbance při 260 nm byla vypočítána koncentrace DNA ve vzorku ($35 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Z poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla stanovena čistota DNA; byl vypočten poměr 1,59 což svědčí o znečištění DNA proteiny.

4.2 Izolace bakteriální DNA pomocí magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA) z hrubých lyzátů buněk s různým pořadím komponent

4.2.1 Magnetická separace a PCR

Optimalizace byla provedena v šesti opakováních. Průměrné množství eluované DNA je uvedeno v Tabulce 11, průměr zbytkového množství v supernatantech je uveden v Tabulce 12. Se získanými eluáty byla provedena PCR, před kterou byla nejprve provedena citlivost nastaveného programu LBC ROD. Gelová elektroforéza PCR produktů na agarose pro zjištění citlivosti je uvedena na Obrázku 4, pod který je uvedeno i schéma nanesení vzorků na gel. Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů po magnetické separaci bakteriální DNA je uvedena na Obrázku 5, výsledky intenzit PCR produktů v Tabulce 13.

Tabulka 11: Množství izolované DNA v eluátu za použití magnetických mikročastic P(HEMA-co-GMA).

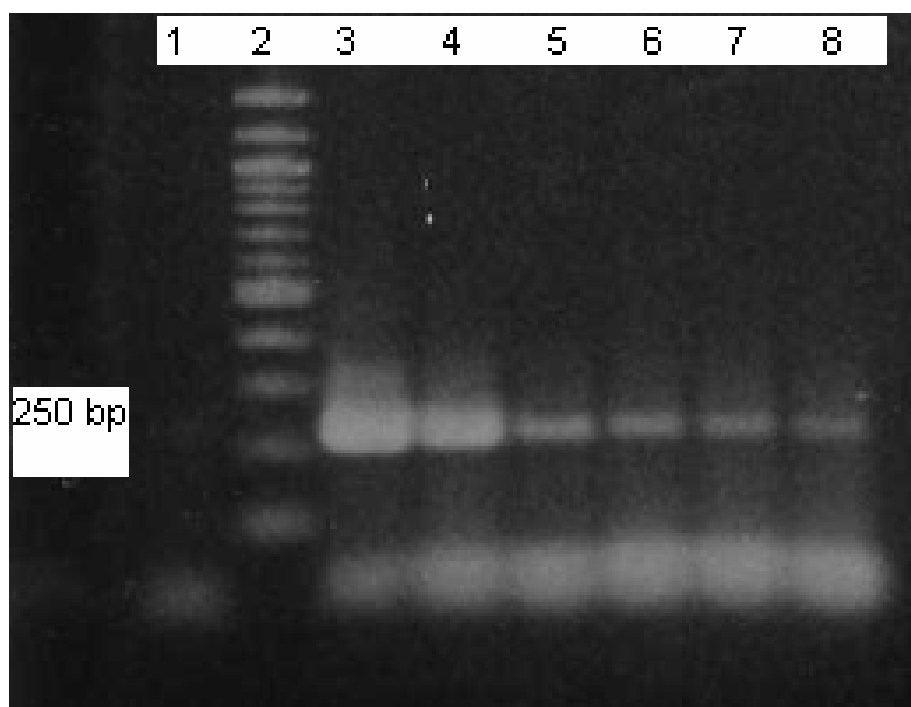
Separací. směs	P(HEMA-co-GMA) (mg/ml)	Detekce DNA
1	2	+
1	5	++
1	10	++
2	2	++
2	5	++
2	10	+
3	2	-
3	5	+
3	10	-
4	2	-
4	5	-
4	10	-
5	2	-
5	5	+
5	10	-
6	2	+
6	5	++
6	10	+

- DNA nebyla detekována
- + DNA detekováno v malém množství
- ++ DNA detekována ve větším množství

Tabulka 12: Množství DNA v supernatantech po adsorpci DNA na magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA).

Separační směs	P(HEMA- <i>co</i> -GMA) (mg/ml)	Detekce DNA
1	2	+++
1	5	+++
1	10	+++
2	2	+++
2	5	+++
2	10	+++
3	2	++
3	5	++
3	10	++
4	2	++
4	5	++
4	10	+
5	2	+++
5	5	+++
5	10	+++
6	2	+++
6	5	+++
6	10	+++

- + DNA detekováno v malém množství
- ++ DNA detekována ve větším množství
- +++ DNA detekována ve velkém množství



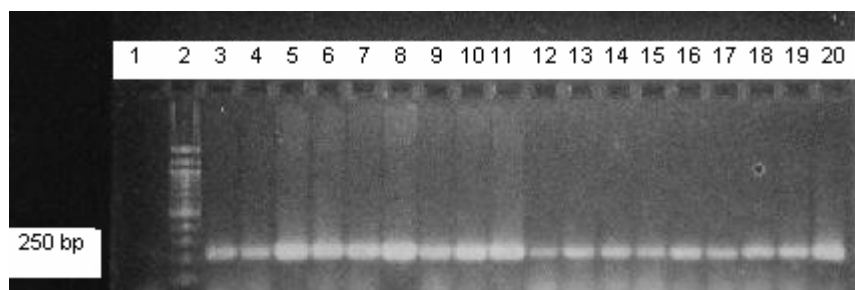
Obrázek 4: Citlivost PCR (program LBC ROD) pro rod *Lactobacillus*.

Běh	DNA	Detekce PCR produktu
1	NK	-
2	100 bp žebříček	+
3	1 ng/μl	+
4	100 pg/μl	+
5	10 pg/μl	+
6	1 pg/μl	+
7	100 fg/μl	+
8	10 fg/μl	+

NK – negativní kontrola

- ... PCR produkt nebyl detekován

+ ... PCR produkt byl detekován



Obrázek 5: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA matrice byla získána za použití šesti separačních směsí s různým pořadím přidávaných komponent a s různou koncentrací P(HEMA-co-GMA). V běhu 1 je negativní kontrola, v běhu 2 standard 100 bp žebříček a v bězích 3-20 vzorky.

Tabulka 13: Celkové zhodnocení intenzity PCR produktu

Separační směs	P(HEMA- <i>co</i> -GMA) (mg/ml)	Běh	Intenzita PCR produktu (250 bp)
1	2	3	+++
1	5	4	+++
1	10	5	+++
2	2	6	+++
2	5	7	+++
2	10	8	++
3	2	9	++
3	5	10	++
3	10	11	+
4	2	12	+
4	5	13	++
4	10	14	++
5	2	15	+
5	5	16	++
5	10	17	++
6	2	18	++
6	5	19	++
6	10	20	+++

+ PCR produkt detekován slabě

++ PCR produkt detekován ve větším množství

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství

Byly testovány čtyři doby eluce: 15, 30, 45, 60 minut. Největší množství eluované DNA bylo docíleno po 30 minutách eluce. Po 45 minutách bylo také eluováno relativně velké množství DNA, ale také mnoho DNA zůstávalo po nanesení na gel v komůrkách - proto bylo od této doby upuštěno. Jako nejméně vhodná doba eluce se jevila doba 60 minut. Dále byl sledován vliv různých koncentrací P(HEMA-*co*-GMA). Protože množství separované DNA bylo nízké na gelu bylo detekováno malé množství DNA, která však byla v množství a kvalitě vhodné pro PCR.

Celkové zhodnocení jednotlivých separačních směsí:

Separační směs 1:

Celkově se pořadí řadilo mezi nejlepší. Byla zjištěna přímá úměra mezi množstvím izolované DNA a koncentrací P(HEMA-*co*-GMA).

Separační směs 2:

Toto pořadí vykazovalo také dobré výsledky při všech použitých koncentracích. P(HEMA-*co*-GMA).

Separační směs 3:

Pořadí se dle své účinnosti izolace DNA řadilo mezi průměrné.

Separační směs 4:

Pořadí se řadilo mezi nejhorší, i když byla zjištěna přímá úměra mezi koncentrací P(HEMA-*co*-GMA) a intenzitou PCR produktu.

Separační směs 5:

Celkově se pořadí jeví jako nejhorší.

Separační směs 6:

Pořadí se řadilo mezi nejlepší, obzvláště při koncentraci P(HEMA-co-GMA) 2 mg/ml. S rostoucí koncentrací magnetického nosiče se ale intenzita PCR produktů snižovala.

4.3 Optimalizace metody adsorpce DNA na magnetické mikročástice

4.3.1 Magnetická separace

Jelikož byla známa koncentrace použité DNA, tak bylo možné spektrofotometricky stanovit absorbance DNA v eluátech a následně tyto hodnoty přepočíst na procentuální výtěžek, což je uvedeno v Tabulce 14.

Tabulka 14: Množství eluované DNA v závislosti na podmínkách separace.

PEG (Mh)	PEG (%)	MN	Průměrný výtěžek DNA (%)
600	4	P(HEMA-co-GMA)	5,08
600	4	MS	5,18
600	8	P(HEMA-co-GMA)	4,84
600	8	MS	7,21
600	12	P(HEMA-co-GMA)	8,52
600	12	MS	5,88
600	16	P(HEMA-co-GMA)	7,18
600	16	MS	4,71
6000	4	P(HEMA-co-GMA)	6,38
6000	4	MS	6,68
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	5,48
6000	8	MS	7,98
6000	12	P(HEMA-co-GMA)	9,22
6000	12	MS	10,29
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	8,62
6000	16	MS	9,39

MN - magnetický nosič

MS – magnetické sklo

Optimalizace byla prováděna za účelem zjištění vhodných podmínek pro izolaci genomové DNA z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* a pro identifikaci rodu *Lactobacillus* ve vybraných mléčných výrobcích.

Vzhledem k tomu, že byla známa koncentrace modelové DNA bylo možné vyhodnotit množství separované DNA za použití různých magnetických nosičů a za různých podmínek separace. Stanovení koncentrace bylo provedeno spektrofotometricky. Ze spočtených hodnot bylo zjištěno, že při použití magnetického skla bylo izolováno více DNA, ale rozdíly nejsou významné. S rostoucí koncentrací a molekulovou hmotností PEG vzrůstá množství izolované DNA. Výsledky jsou statisticky vyhodnocovány.

Práce s oběma magnetickými nosičem byla dobrá. Magnetické sklo mě slabší magnetické vlastnosti, což se projevilo delší dobou separace částic.

4.4 Izolace DNA z bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*

4.4.1 Magnetická separace a PCR

Celkové zhodnocení všech výsledků separace DNA je uvedeno v Tabulce 15, množství DNA zbylé v supernatantech v Tabulce 16, Vyhodnocení intenzit ampliconů je uvedeno v Tabulce 17 a obrázek agarosové gelové elektroforézy po PCR na Obrázku 6. Jelikož byla známa koncentrace DNA ve výchozím vorku (15,66 µg/ml), tak bylo možné stanovit výtěžek DNA po magnetické separaci (Tabulka 18). Koncentrace RNA ve výchozím vzorku byla také známa (376 µg/ml), a proto byla stanoveno množství eluované RNA, které se eluuje spolu s DNA, (Tabulka 19).

Tabulka 15: Množství izolované DNA při použití magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA) a magnetického skla

PEG(Mh)	PEG (%)	MN	Detekce DNA
600	4	P(HEMA-co-GMA)	-
600	4	MS	-
600	8	P(HEMA-co-GMA)	-
600	8	MS	-
600	12	P(HEMA-co-GMA)	-
600	12	MS	-
600	16	P(HEMA-co-GMA)	+
600	16	MS	+
6000	4	P(HEMA-co-GMA)	-
6000	4	MS	-
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	+
6000	8	MS	+
6000	12	P(HEMA-co-GMA)	+
6000	12	MS	+
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	+
6000	16	MS	+

MN ... magnetický nosič

MS ... magnetické sklo

- DNA nebyla detekována

+ DNA detekováno v malém množství

Tabulka 16: Množství DNA v supernatantech po adsorpci bakteriální DNA na magnetické mikročástice P(HEMA-co-GMA) a magnetické sklo.

PEG (Mh)	PEG (%)	MN	Detekce DNA
600	4	P(HEMA-co-GMA)	+++
600	4	MS	+++
600	8	P(HEMA-co-GMA)	+++
600	8	MS	+++
600	12	P(HEMA-co-GMA)	+++
600	12	MS	+++
600	16	P(HEMA-co-GMA)	++
600	16	MS	++
6000	4	P(HEMA-co-GMA)	+++
6000	4	MS	+++
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	++
6000	8	MS	++
6000	12	P(HEMA-co-GMA)	++
6000	12	MS	++
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	++
6000	16	MS	++

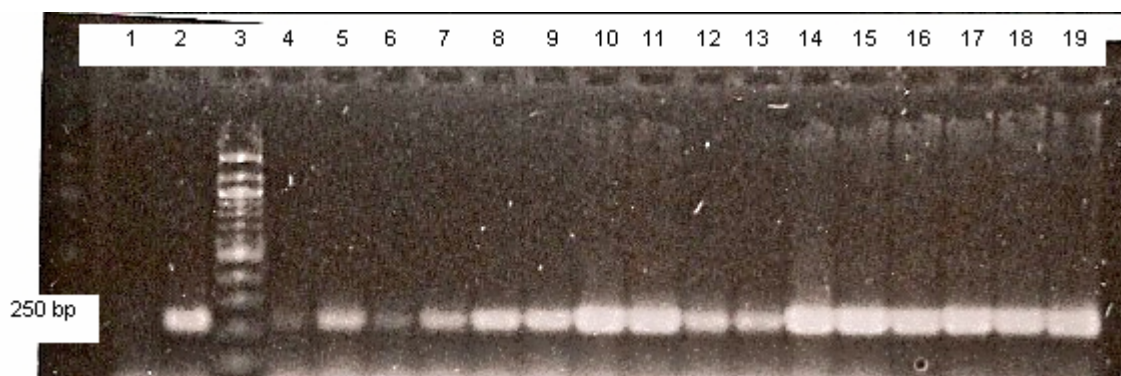
MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

+ DNA detekováno v malém množství

++ DNA detekována ve větším množství

+++ DNA detekována ve velkém množství



Obrázek 6: Gelová elektroforéza PCR produktu (250 bp). Negativní kontrola byla v běhu 1, pozitivní kontrola v běhu 2, DNA matrice získaná za různých podmínek separace v bžích 4 - 19.

Tabulka 17: Intenzita PCR produktů po separaci bakteriální DNA magnetickými částicemi

PEG (Mh)	PEG (%)	MN	Běh	Intenzita PCR produktu
600	4	P(HEMA-co-GMA)	4	+
600	4	MS	5	++
600	8	P(HEMA-co-GMA)	6	+
600	8	MS	7	++
600	12	P(HEMA-co-GMA)	8	++
600	12	MS	9	++
600	16	P(HEMA-co-GMA)	10	+++
600	16	MS	11	+++
6000	4	P(HEMA-co-GMA)	12	++
6000	4	MS	13	++
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	14	+++
6000	8	MS	15	+++
6000	12	P(HEMA-co-GMA)	16	+++
6000	12	MS	17	+++
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	18	+++
6000	16	MS	19	+++

MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

+ DNA detekováno v malém množství

++ DNA detekována ve větším množství

+++ DNA detekována ve velkém množství

Tabulka 18: Množství separované bakteriální DNA za různých podmínek adsorpce

PEG(Mh)	PEG (%)	MN	Výtěžek DNA (%)
600	4	P(HEMA-co-GMA)	0,32
600	4	MS	1,57
600	8	P(HEMA-co-GMA)	0,34
600	8	MS	0,77
600	12	P(HEMA-co-GMA)	0,42
600	12	MS	1,42
600	16	P(HEMA-co-GMA)	1,90
600	16	MS	4,74
6000	4	P(HEMA-co-GMA)	0,56
6000	4	MS	1,07
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	2,31
6000	8	MS	4,31
6000	12	P(HEMA-co-GMA)	4,50
6000	12	MS	5,96
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	4,21
6000	16	MS	7,78

MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

Tabulka 19: Množství eluované RNA za různých podmínek separace.

Eluát	PEG (Mh)	PEG (%)	MN (0,2 mg/ml)	Výtěžek RNA (%)
1	600	4	P(HEMA-co-GMA)	0,16
2	600	4	MS	0,26
3	600	8	P(HEMA-co-GMA)	0,18
4	600	8	MS	0,35
5	600	12	P(HEMA-co-GMA)	0,27
6	600	12	MS	0,67
7	600	16	P(HEMA-co-GMA)	0,55
8	600	16	MS	1,11
9	6000	4	P(HEMA-co-GMA)	0,26
10	6000	4	MS	0,35
11	6000	8	P(HEMA-co-GMA)	0,54
12	6000	8	MS	1,05
13	6000	12	P(HEMA-co-GMA)	0,83
14	6000	12	MS	1,42
15	6000	16	P(HEMA-co-GMA)	1,07
16	6000	16	MS	1,76

MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

Koncentrace eluované DNA byly velmi nízké, a proto nebylo možné DNA detekovat pomocí agarosové gelové elektroforézy. Proto bylo použito fluorometrické stanovení koncentrace separované DNA. Výchozí koncentrace DNA bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* byla 15,66 µg/ml. S rostoucí molekulovou hmotností a koncentrací PEG se zvyšovalo eluované množství DNA. Rozdíly byly i v použitých magnetických mikročasticích. Magnetickým sklem bylo izolováno větší množství DNA. Z magnetických mikročastic se eluuje jen velmi malé množství RNA. Byl zjištěn stejný trend jako u množství eluované DNA při použití PEG o různé molekulové hmotnosti a koncentraci v směsi.

Amplifikace proběhla u všech vzorků, ale byly získány PCR produkty o různé intenzitě. Nejintenzivnější amplikony byly získány u vzorků ve kterých byla DNA izolována v prostředí PEG o molekulové hmotnosti 6000.

Rozdíly v použití různých magnetických nosičů nebyly zásadní, práce s nosičem P(HEMA-co-GMA) byla ale snazší. Oproti magnetickému sklu lze mikročastice dobře separovat pomocí magnetického separátoru. Nedocházelo k tomu, že částice zůstávaly rozptýleny v supernatantu.

4.5 Identifikace rodu *Lactobacillus* v tekutých mléčných výrobcích

4.5.1 Magnetická separace (standardní postup) a PCR

Množství DNA izolované pomocí mikročastic P(HEMA-co-GMA) je uvedeno v Tabulce 20, pomocí magnetického skla v Tabulce 22. Množství zbytkové DNA v supernatantech po separaci mikročasticemi P(HEMA-co-GMA) je uvedeno v Tabulce 21, po separaci magnetickým sklem v Tabulce 23. Se získanými eluáty byla provedena PCR pro identifikaci rodu *Lactobacillus*. Intenzity PCR produktů, kdy byla DNA izolována mikročasticemi P(HEMA-co-GMA), jsou uvedeny v Tabulce 24 a na Obrázku 7. V Tabulce 25 a na Obrázku 8 jsou uvedeny výsledky PCR pro DNA separovanou magnetickým sklem.

Tabulka 20: Množství izolované DNA za použití magnetických mikročastic P(HEMA-co-GMA).

PEG (Mh)	PEG (%)	DNA	Detekce DNA
600	8	A	-
600	8	B	-
600	8	C	-
600	8	D	-
600	16	A	-
600	16	B	-
600	16	C	-
600	16	D	-
6000	8	A	-
6000	8	B	-
6000	8	C	-
6000	8	D	-
6000	16	A	-
6000	16	B	-
6000	16	C	-
6000	16	D	-

A - eluát DNA z mléčného výrobku A

B - eluát DNA z mléčného výrobku B

C - eluát DNA z mléčného výrobku C

D - eluát DNA z mléčného výrobku D

- DNA nebyla detekována

Tabulka 21: Množství DNA v supernatantech po adsorpci DNA na magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA).

PEG (Mh)	PEG (%)	Vzorek	Detekce DNA
600	8	A	+
600	8	B	+
600	8	C	+
600	8	D	+
600	16	A	+
600	16	B	+
600	16	C	+
600	16	D	+
6000	8	A	+
6000	8	B	+
6000	8	C	+
6000	8	D	+
6000	16	A	+
6000	16	B	+
6000	16	C	+
6000	16	D	+

A – supernatant mléčného výrobku A

B – supernatant mléčného výrobku B

C – supernatant mléčného výrobku C

D – supernatant mléčného výrobku D

+ DNA detekováno v malém množství

Tabulka 22: Množství izolované DNA za použití magnetického skla.

PEG Mh	PEG (%)	DNA	Detekce DNA
600	8	A	-
600	8	B	-
600	8	C	-
600	8	D	-
600	16	A	-
600	16	B	-
600	16	C	-
600	16	D	-
6000	8	A	-
6000	8	B	-
6000	8	C	-
6000	8	D	-
6000	16	A	-
6000	16	B	-
6000	16	C	-
6000	16	D	-

A - eluát z mléčného výrobku A

B - eluát z mléčného výrobku B

C - eluát z mléčného výrobku C

D - eluát z mléčného výrobku D

- DNA nebyla detekována

Tabulka 23: Množství DNA v supernatantech po adsorpci DNA na magnetické sklo.

PEG Mh	PEG (%)	DNA	Detekce DNA
600	8	A	+
600	8	B	+
600	8	C	+
600	8	D	+
600	16	A	+
600	16	B	+
600	16	C	+
600	16	D	+
6000	8	A	+
6000	8	B	+
6000	8	C	+
6000	8	D	+
6000	16	A	+
6000	16	B	+
6000	16	C	+
6000	16	D	+

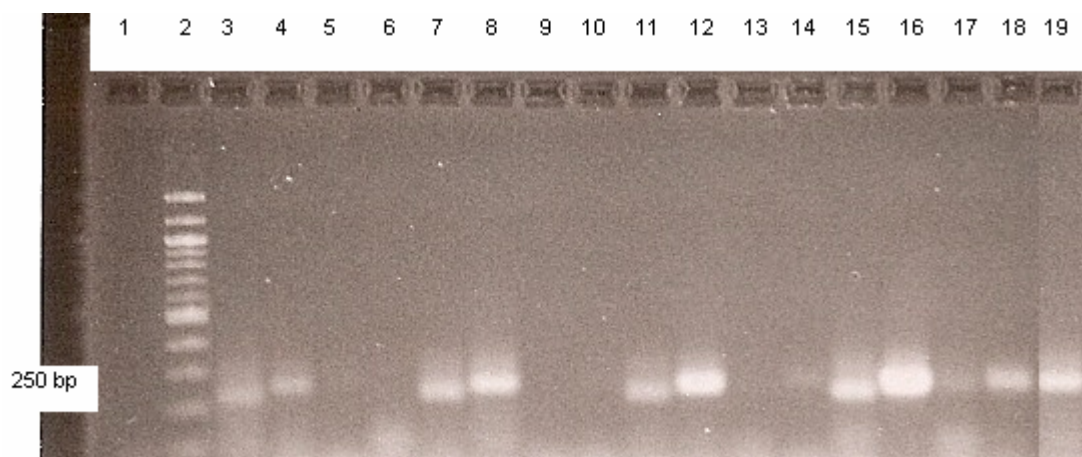
A – supernatant mléčného výrobku A

B – supernatant mléčného výrobku B

C – supernatant mléčného výrobku C

D – supernatant mléčného výrobku D

+ DNA detekováno v malém množství



Obrázek 7: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktu (250 bp). Běh 1: negativní kontrola, běh 2: DNA standard (žebříček), běhy 3-18: PCR produkty (viz. Tabulka 25), běh 19: pozitivní kontrola.

Tabulka 24: Intenzita PCR produktů po izolaci DNA z mléčného výrobku magnetickými mikročasticemi P(HEMA-*co*-GMA).

PEG (Mh)	PEG (%)	DNA	PCR produkt
600	8	A	+
600	8	B	+
600	8	C	-
600	8	D	-
600	16	A	++
600	16	B	++
600	16	C	-
600	16	D	-
6000	8	A	+
6000	8	B	+++
6000	8	C	-
6000	8	D	+
6000	16	A	++
6000	16	B	+++
6000	16	C	+
6000	16	D	++

A - eluát DNA z mléčného výrobku A

B - eluát DNA z mléčného výrobku B

C - eluát DNA z mléčného výrobku C

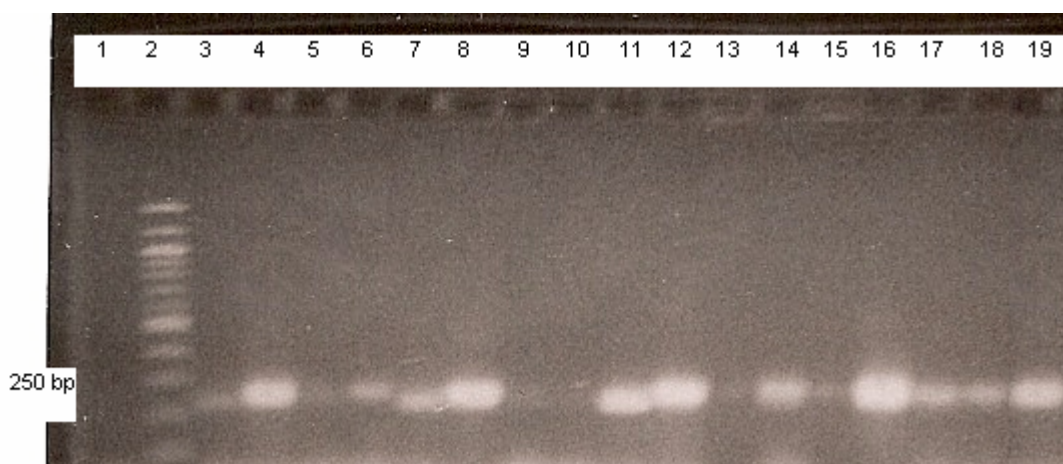
D - eluát DNA z mléčného výrobku D

- PCR produkt nebyl detekován

+ PCR produkt detekován slabě

++ PCR produkt detekován ve větším množství

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství



Obrázek 8: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktu (250 bp). Běh 1: negativní kontrola, běh 2: DNA standard (žebříček), běhy 3-18: PCR produkty (viz. Tabulka 26), běh 19: pozitivní kontrola.

Tabulka 25: Zhodnocení intenzit PCR produktů. DNA byla separována magnetickým sklem.

PEG (Mh)	PEG (%)	DNA	Intenzita PCR produktu
600	8	A	+
600	8	B	+++
600	8	C	+
600	8	D	++
600	16	A	++
600	16	B	+++
600	16	C	+
600	16	D	+
6000	8	A	+++
6000	8	B	+++
6000	8	C	+
6000	8	D	++
6000	16	A	+
6000	16	B	+++
6000	16	C	++
6000	16	D	++

A - eluát DNA z mléčného výrobku A

B - eluát DNA z mléčného výrobku B

C - eluát DNA z mléčného výrobku C

D - eluát DNA z mléčného výrobku D

+ PCR produkt detekován slabě

++ PCR produkt detekován ve větším množství

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství

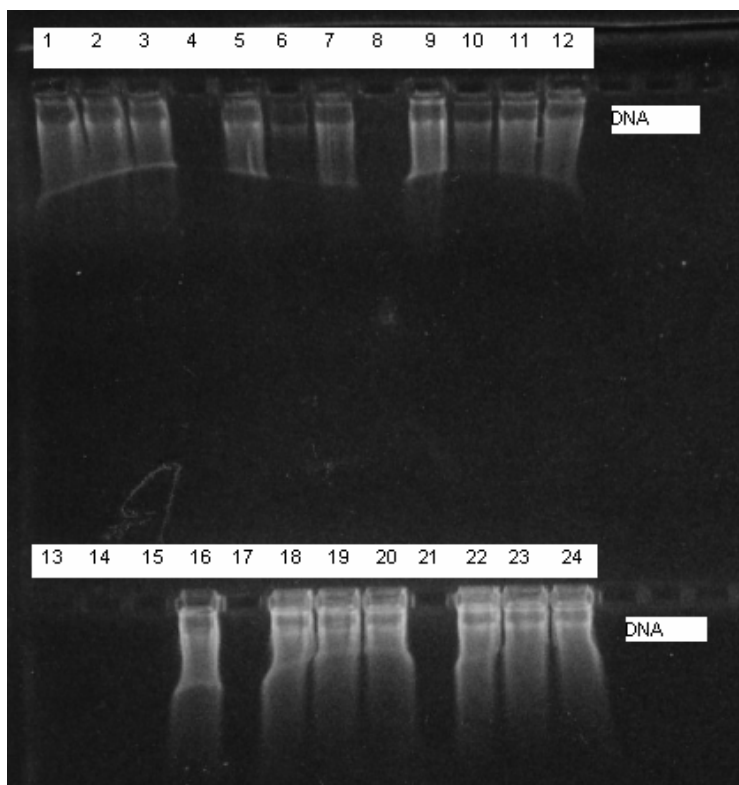
Byly vybrány 4 tekuté mléčné výrobky. Ani jeden z výrobků nebyl obarven potravinářskými barvivy a všechny měly deklarován obsah bakterie rodu *Lactobacillus*. Z hrubých lyzátů byla provedena separace DNA pomocí dvou druhů magnetických mikročastic, při použití PEG o různé molekulové hmotnosti a různé koncentraci. Gelovou elektroforézou nebyla DNA detekována v eluátech ale byla detekována v supernatantech..

Zhodnocení podmínek separace a identifikace bakterií rodu *Lactobacillus* bylo provedeno po zjištění intenzity PCR produktů. Nejprve byl program LBC ROD nastaven na 30 cyklů. Získané PCR produkty měly v mnoha případech velmi nízkou intenzitu nebo nebyly detekovány. Proto byl počet cyklů zvýšen na 39. Výsledky jsou vyhodnoceny v Tabulkách 24 a 25. Dle intenzit PCR produktů se lze usuzovat, že více DNA bylo izolováno pomocí magnetického skla. S tímto nosičem se ale obtížněji pracovalo. Částice byly po magnetické separaci rozptýlené v separační směsi (byly méně magnetické) a v několika případech byly odebrány se supernatantem, což u magnetických mikročastic P(HEMA-co-GMA) nenastávalo. Dalším kritériem pro posouzení množství separované DNA byla molekulová hmotnost PEG. Více DNA bylo izolováno za použití PEG o vyšší molekulové hmotnosti a množství separované DNA vzrůstalo se vzrůstající výslednou koncentrací PEG.

4.6 Identifikace rodu *Lactobacillus* v tekutých mléčných výrobcích

4.6.1 Studium chování DNA ve dvoufázovém systému

Před aplikací dvoufázového systému (kapalina-kapalina) na reálné vzorky bylo provedeno studium chování DNA v modelovém systému. Nejprve byl sledováno chování DNA z kuřecích erytrocytů (1 mg/ml). Fotografie agarosové gelové elektroforézy je uvedena na Obrázku 9, v Tabulka 26 je schéma nanesení vzorků na gel a popis chování DNA. Následně bylo studováno chování DNA izolované z bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (485 ng/μl). Fotografie agarosové gelové elektroforézy je na Obrázku 10 a schéma nanesení vzorků na gel se zhodnocením výsledků v Tabulce 27.



Obrázek 9. Agarosová gelová elektroforéza. DNA z kuřecích erytrocytů – dvoufázový systém (kapalina-kapalina).

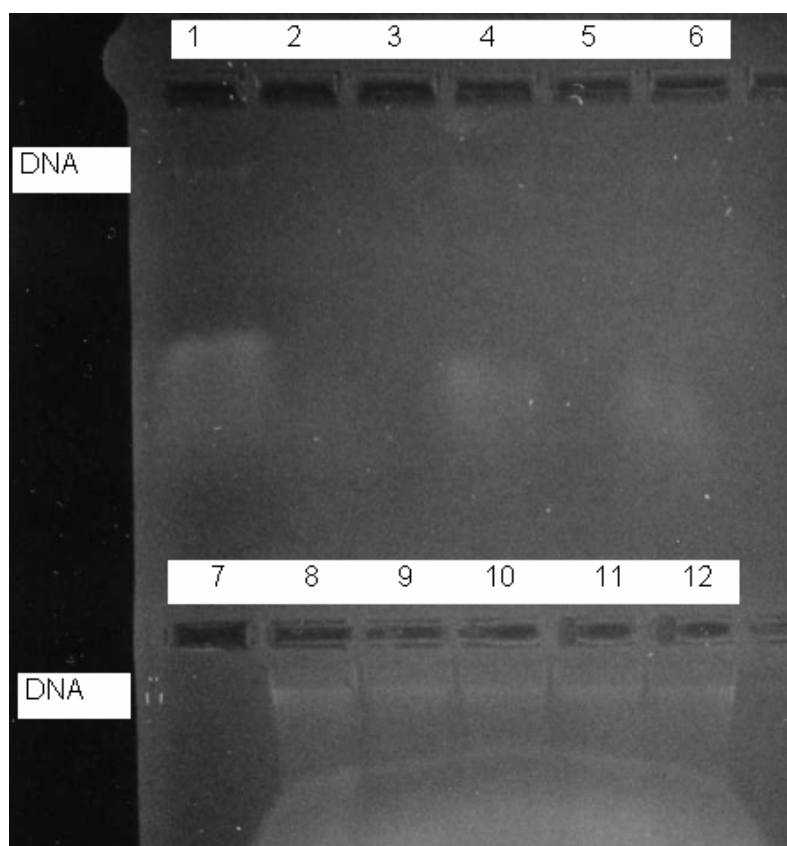
Tabulka 26: Schéma nanesení vzorků na gel při studiu chování DNA z kuřecích erytrocytů .

Běh	Fáze	DFS	16% PEG (Mh)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	DNA
1	Horní	ne	600	6,13	+
2		ne	600	9,95	+
3		ne	600	13,76	+
4		ano	600	17,57	-
5		ne	6000	6,13	+
6		ano	6000	9,95	+
7		ano	6000	13,76	+
8		ano	6000	17,57	-
9		ne	8000	6,13	-
10		ano	8000	9,95	+
11		ano	8000	13,76	+
12		ano	8000	17,57	+
13	Dolní	ne	600	6,13	-
14		ne	600	9,95	-
15		ne	600	13,76	-
16		ano	600	17,57	+
17		ne	6000	6,13	-
18		ano	6000	9,95	+
19		ano	6000	13,76	+
20		ano	6000	17,57	+
21		ano	8000	6,13	-
22		ano	8000	9,95	+
23		ano	8000	13,76	+
24		ano	8000	17,57	+

Koncentrace NaCl 3,52 %.

- DNA nebyla detekována

+ DNA byla detekována



Obrázek 10: Agarosová gelová elektroforéza DNA izolované z bakteriální kultury. Dvoufázový vodný systém (kapalina-kapalina).

Tabulka 27: Schéma nanesení vzorků na gel při studiu chování bakteriální DNA ve dvoufázovém systému.

Běh	Fáze	DFS	16% PEG (Mh)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	DNA
1	Horní	ne	600	13,76	+
2		ano	600	17,57	-
3		ano	6000	13,76	-
4		ano	6000	17,57	+
5		ano	8000	13,76	-
6		ano	8000	17,57	+
7	Dolní	ne	600	13,76	-
8		ano	600	17,57	+
9		ano	6000	13,76	+
10		ano	6000	17,57	+
11		ano	8000	13,76	+
12		ano	8000	17,57	+

Koncentrace NaCl 3,52 %.

- DNA nebyla detekována

+ DNA byla detekována

Pro vytvoření dvoufázového systému byla použita směs následujících složek: PEG o různé molekulové hmotnosti (600, 6000 a 8000 g/mol) a výsledné koncentraci 16%hm., síran amonný o různých výsledných koncentracích (6,13%; 9,95%; 13,76%; 17,57%) a NaCl o

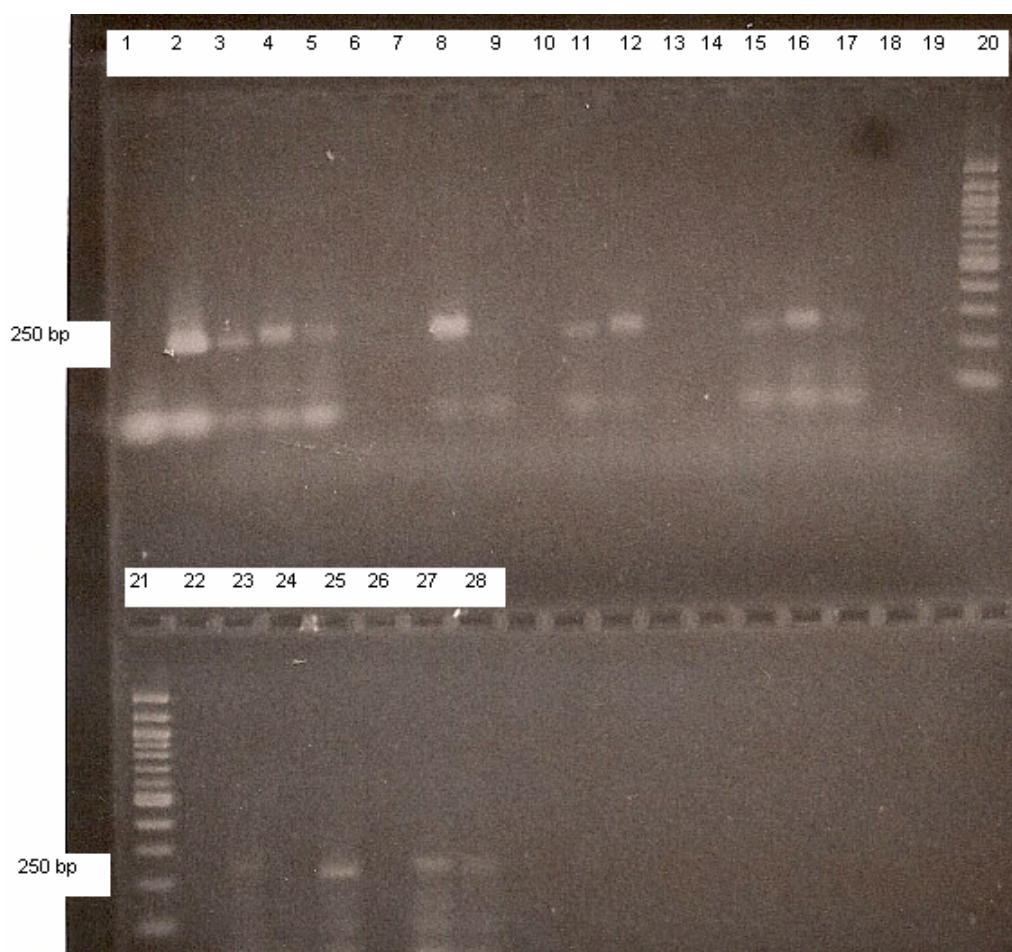
výsledné koncentraci 3,52%. Čtyři různé koncentrace síranu amonného byly použity při studium chování DNA z kuřecích erytrocytů; při použití bakteriální DNA byly použity dvě nejvyšší koncentrace síranu amonného.

Z Tabulek je zřejmé, za jakých podmínek byl vytvořen dvoufázový systém a ve které fázi byla DNA detekována. Zjištění do které fáze DNA přejde bylo pro další práci nutné, protože v druhé variantě byly magnetické mikročástice přidávány do směsi až po odebrání fáze chudé na DNA (horní fáze), tedy ve skutečnosti ke spodní fázi.

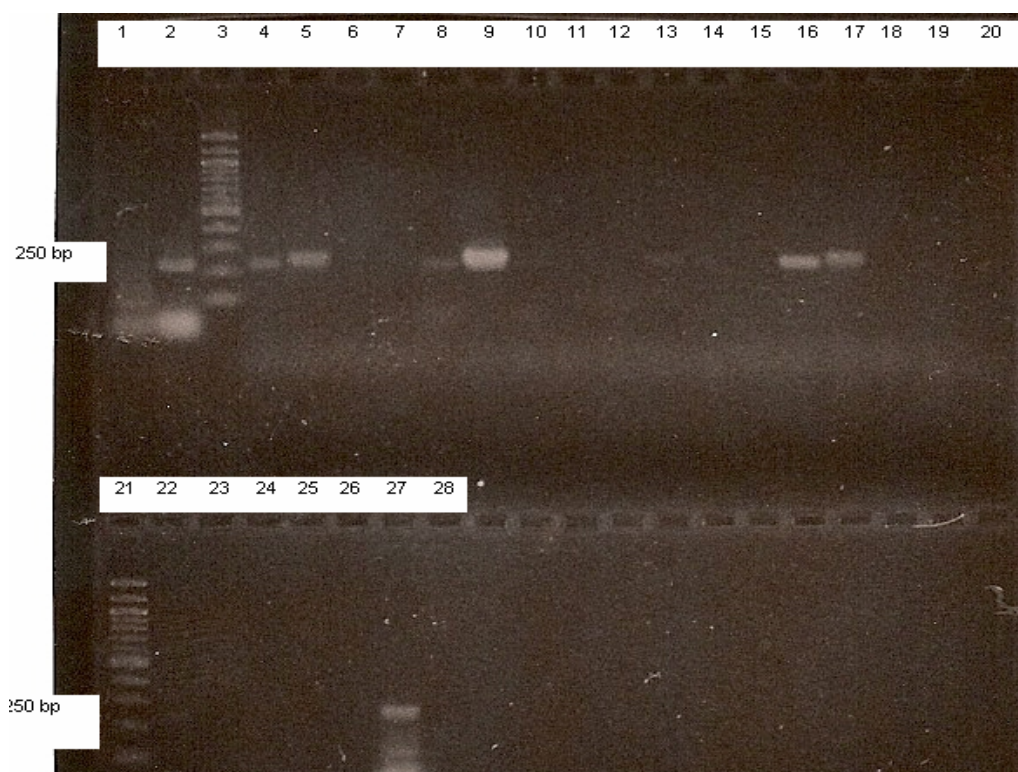
4.6.2 Izolace DNA z tekutých mléčných výrobcích s následnou PCR

DNA byla izolována ze čtyř vzorků tekutých mléčných výrobků s použitím postupů I-IV (viz, 3.1.5.11). Postup IV nebylo možné vyhodnotit - důvod je diskutován na konci této kapitoly.

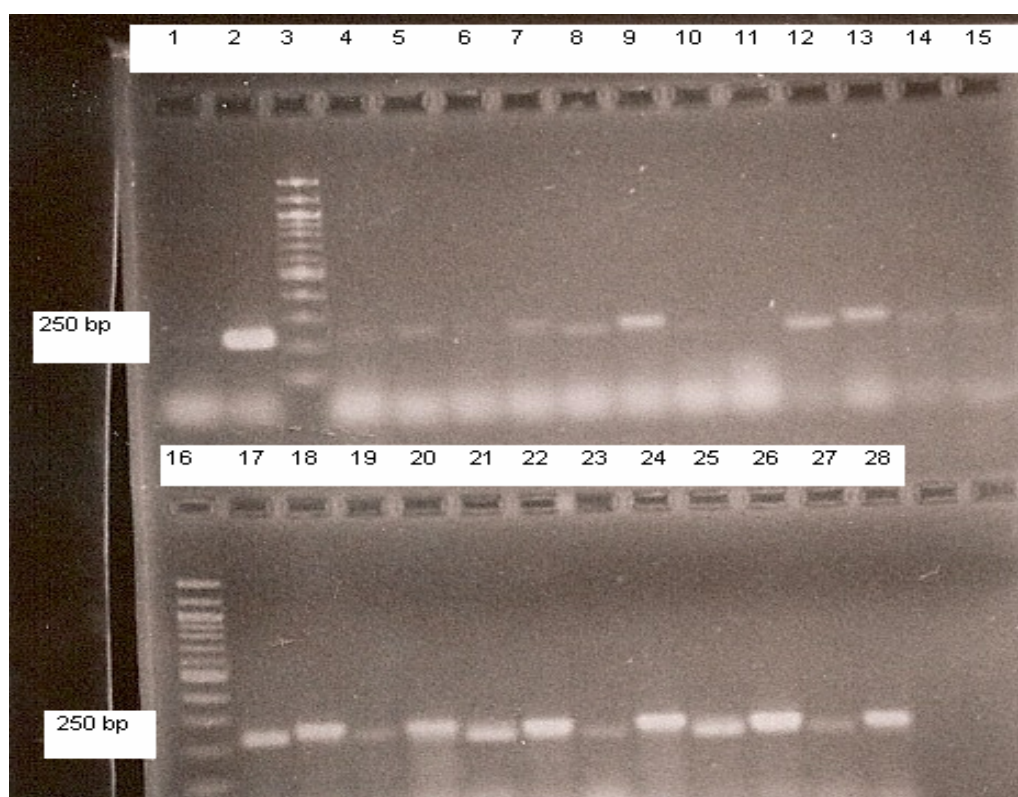
S eluáty získanými postupy I, II a III byla provedena PCR pro identifikaci rodu *Lactobacillus*. Intenzity PCR produktů, kdy byla DNA izolována postupy I a II pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA), což nese označení MS1 a magnetického skla, což bylo označeno jako MS2, jsou uvedeny v Tabulce 28; v Tabulce 29 jsou vyhodnoceny výsledky po izolaci DNA Postupem III pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA) (MS1) a magnetického skla (MS2). Agarosové gelové elektroforézy PCR produktů (DNA izolovaná postupy I-III) jsou na Obrázcích 11-16.



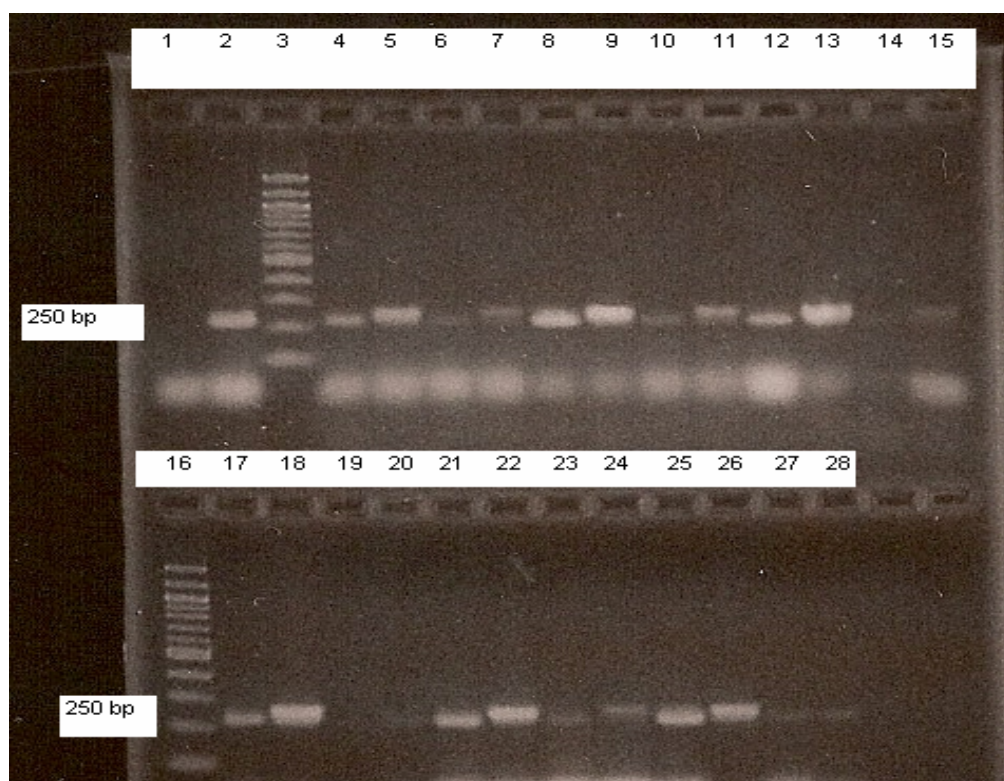
Obrázek 11: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA byla izolována postupem I pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA). Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běhy 3-19, 22-28: PCR produkty (viz Tabulka 28); běhy 20 a 21: DNA standard (100 bp žebříček).



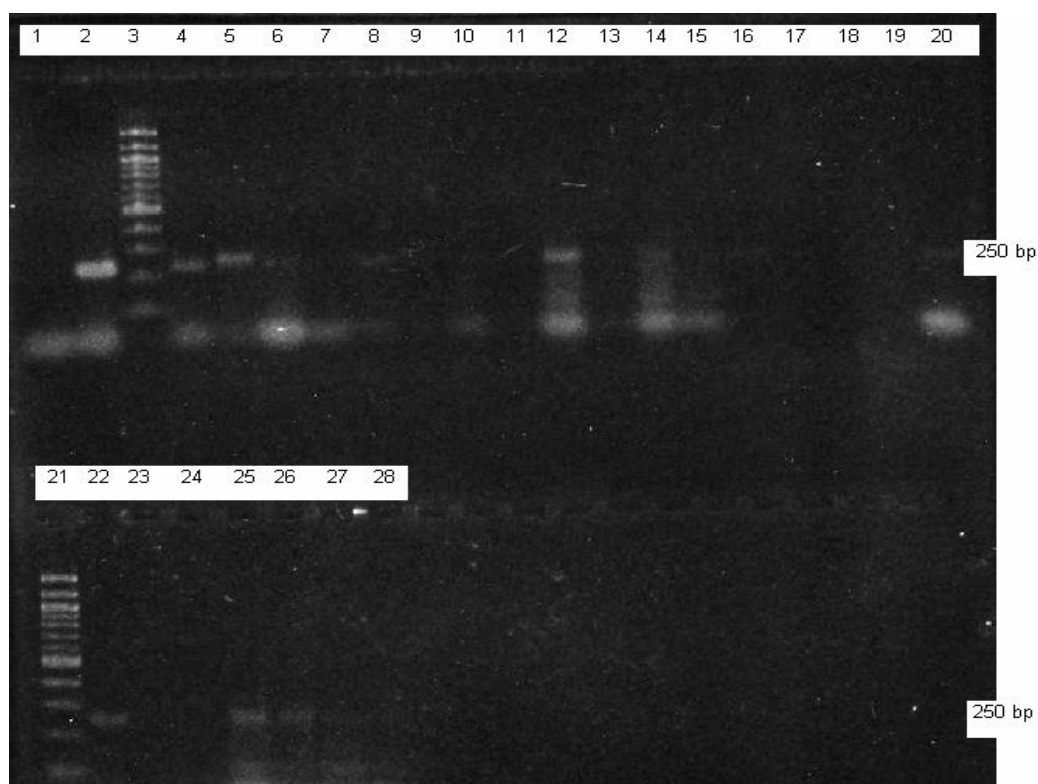
Obrázek 12: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA izolována postupem I pomocí částic magnetického skla. Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běhy 3 a 21 DNA standard (100 bp žebříček), běhy 4-20, 21-28: PCR produkty (viz Tabulka 28).



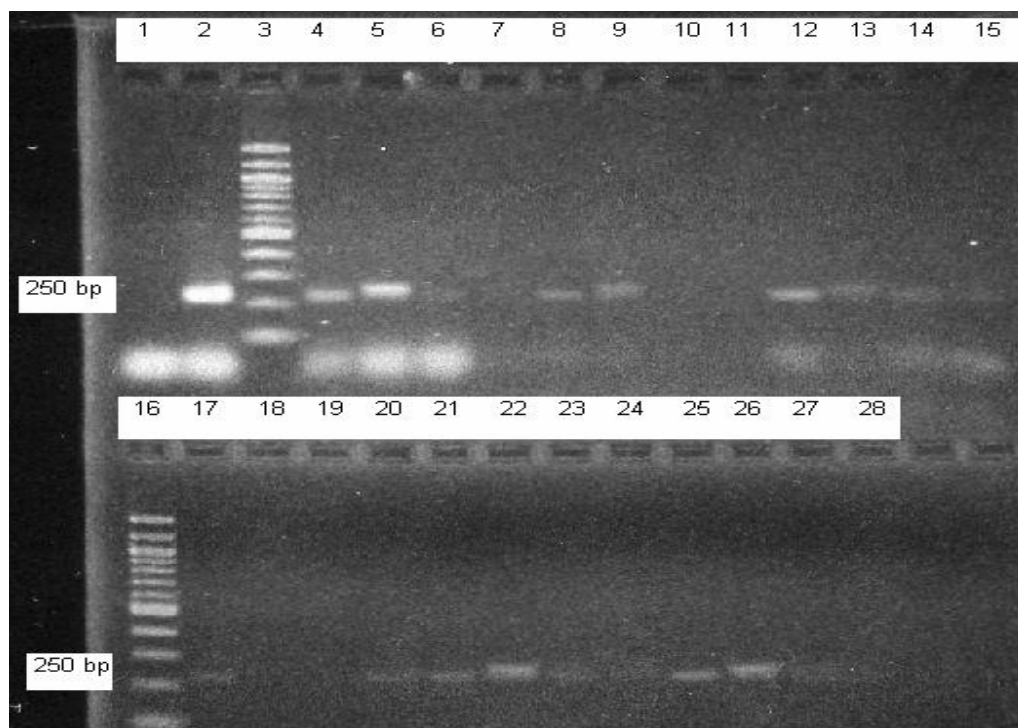
Obrázek 13: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA byla izolována postupem II pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA). Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běhy 3 a 16: DNA standard (100 bp žebříček), běhy 4-15, 17-28: PCR produkty (viz Tabulka 28).



Obrázek 14: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA byla izolována postupem II pomocí částic magnetického skla. Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běhy 3 a 16: DNA standard (100 bp žebříček), běhy 4-15, 17-2: PCR produkty (viz. Tabulka 28).



Obrázek 15: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA byla izolována postupem III pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA). Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běh 3 a 21: DNA standard (100 bp žebříček), běhy 4-20, 22-28: PCR produkty (viz Tabulka 29).



Obrázek 16: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů. DNA byla izolována postupem III pomocí částic magnetického skla. Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běhy 3 a 16: DNA standard (100 bp žebříček), běhy 4-15, 17-28: PCR produkty (viz. Tabulka 29).

Tabulka 28: Zhodnocení intenzit PCR produktů. DNA byla separována postupy I a II. Byly použity magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) a magnetické sklo.

Vzorek	PEG	(NH ₄) ₂ SO ₄	Postup I			Postup II	
	(Mh)	(%)	Běh	MS1	MS2	MS1	MS2
A	600	13,76	3	+	+	+	+
B	600	13,76	4	+	+	+	++
C	600	13,76	5	+	-	+	+
D	600	13,76	6	-	-	+	+
A	600	17,57	7	-	+	+	+++
B	600	17,57	8	++	+++	++	+++
C	600	17,57	9	-	-	+	+
D	600	17,57	10	-	-	+	+
A	6000	13,76	11	+	-	++	+
B	6000	13,76	12	+	+	++	+++
C	6000	13,76	13	-	-	+	+
D	6000	13,76	14	-	-	+	+
A	6000	17,57	15	+	+	++	+
B	6000	17,57	16	+	+	+++	+++
C	6000	17,57	17	+	-	+	-
D	6000	17,57	18	-	-	+++	+
A	8000	13,76	19	-	-	+++	++
B	8000	13,76	22	-	-	+++	+++
C	8000	13,76	23	+	-	+	+
D	8000	13,76	24	-	-	+++	+
A	8000	17,57	25	+	-	++	+++
B	8000	17,57	26	-	-	+++	+++
C	8000	17,57	27	+	++	+	+
D	8000	17,57	28	+	-	++	+

A - eluát DNA z mléčného výrobku A

B - eluát DNA z mléčného výrobku B

C - eluát DNA z mléčného výrobku C

D - eluát DNA z mléčného výrobku D

MS1 – magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA)

MS2 – částice magnetického skla

- nedetekován žádný PCR produkt

- PCR produkt nebyl detekován

+ PCR produkt detekován slabě

++ PCR produkt detekován ve větším množství

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství

Tabulka 29: Zhodnocení intenzit PCR produktů. DNA byla separována postupem III. Byly použity magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) a magnetické sklo.

Vzorek	PEG (Mh)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Částice		
			Běh	MS1	MS2
A	600	13,76	4	+	+
B	600	13,76	5	+	++
C	600	13,76	6	+	+
D	600	13,76	7	-	-
A	600	17,57	8	+	+
B	600	17,57	9	-	+
C	600	17,57	10	-	-
D	600	17,57	11	-	-
A	6000	13,76	12	+	+
B	6000	13,76	13	-	+
C	6000	13,76	14	+	+
D	6000	13,76	15	+	+
A	6000	17,57	16	+	+
B	6000	17,57	17	-	-
C	6000	17,57	18	-	-
D	6000	17,57	19	-	+
A	8000	13,76	20	+	+
B	8000	13,76	22	+	+
C	8000	13,76	23	-	+
D	8000	13,76	24	-	+
A	8000	17,57	25	+	+
B	8000	17,57	26	+	+
C	8000	17,57	27	-	+
D	8000	17,57	28	-	-

A - eluát DNA z mléčného výrobku A

B - eluát DNA z mléčného výrobku B

C - eluát DNA z mléčného výrobku C

D - eluát DNA z mléčného výrobku D

MS1 magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA)

MS2 – částice magnetického skla

- PCR produkt nebyl detekován

+ PCR produkt detekován slabě

++ PCR produkt detekován ve větším množství

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství

Program LBC ROD byl nastaven na 30 cyklů. Byly ověřovány následující postupy:

Postup I:

PCR produkty, byly málo intenzivní, nebo nebyly detekovány vůbec. (uvést nejlepší koncentraci) Z uvedeného lze vyvozovat, že počet cílových molekul byl nízký nebo eliminace inhibitorů DNA byla nedostatečná. To platilo, jak pro separaci magnetickými mikročásticemi P(HEMA-*co*-GMA), tak i pro magnetické sklo. Možný vliv na malé množství eluované DNA měla skutečnost, že oba druhy magnetických mikročástic byly zadržovány

v horní fázi., Směs bylo nutné intenzivně promíchávat; promíchávání bylo zřejmě nedostačující pro kontakt magnetických mikročástic s DNA ve fázi spodní fázi.

Postup II:

Podle intenzit PCR produktů lze konstatovat, že došlo k eliminaci vlivu PCR inhibitorů PCR. Většina PCR produktů byla intenzivní až velmi intenzivní (uvést nejlepší koncentraci), Z uvedeného lze usuzovat, že pro identifikaci mikroorganismů v tekutých mléčných výrobcích je tento postup velmi vhodnou metodou u tohoto typu výrobků (lze to tak napsat?).

Výsledky metody jsou nejlepší a ve srovnání se standardním postupem magnetické separace (pouze PEG 6000 a NaCl, viz 3.1.5.9.) je výsledek aplikace této pro izolaci bakteriální DNA v kvalitě vhodné pro PCR z tekutých mléčných výrobků také mnohem lepší, protože při PCR vycházející z DNA získané standardním postupem byl počet cyklů navýšen na 39 a při použití DNA získaných metodou B byl program nastaven na cyklů 30.

Postup III:

Postup při této metodě se vcelku shodoval s postupem I s rozdílem, že do separační směsi nebyl přidáván NaCl. Intenzita PCR produktů nasvědčuje ve prospěch postupu III, kterým byla získána DNA matrice pro následnou PCR. Lepší výsledky byly docíleny při separaci DNA magnetickým sklem.

Postup IV:

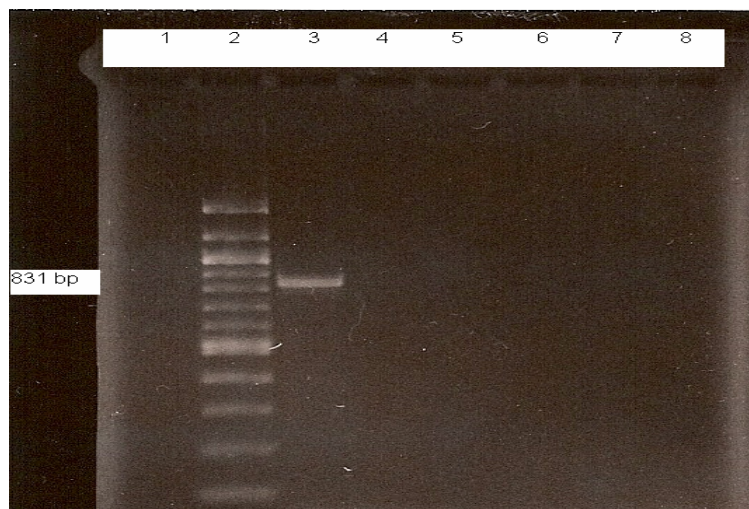
V postupu IV, ve kterém nebyl přidáván 5 mol/l NaCl, nedošlo k vytvoření dvoufázové systém u směsí, ve kterých byl použit PEG 600 a síran amonný o výsledné koncentraci 17,57%. Ze skutečnosti, že DNA nebyly amplifikovány lze vysvětlit dvěma způsoby.

- nedošlo ke kondenzaci DNA a její následné adsorpci na magnetické částice,
- nedošlo k odseparování inhibitorů PCR.

4.7 Identifikace bakterií druhu *Bifidobacterium longum* ve vzorku tvrdého sýru

4.7.1 Citlivost PCR

Citlivost PCR byla provedena podle programu MATSUKI, která je i schématem nanesení vzorků na gel při provádění agarosové gelové elektroforézy. Výsledek agarosové gelové elektroforézy PCR produktů je na Obrázku 17, pod který je uvedeno i schéma nanesení na gel.



Obrázek 17: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktu - citlivost PCR pro druh *Bifidobacterium longum*, program MATSUKI.

Běh	DNA	Detekce PCR produktu
1	NK	-
2	100 bp žebříček	+
3	1 ng/μl	+
4	100 pg/μl	+
5	10 pg/μl	-
6	1 pg/μl	-
7	100 fg/μl	-
8	10 fg/μl	-

NK – negativní kontrola

- PCR produkt nebyl detekován

+ PCR produkt detekován slabě

Citlivost PCR (programu MATSUKI) při použití druhově specifických primerů BiLON 1 a BiLON 2 pro druh *Bifidobacterium longum*, byla 100 pg/μl DNA ve výchozím vzorku (PCR produkt není viditelný na Obrázku 17, ale na transiluminátoru byl slabě viditelný).

4.7.2 Izolace DNA a PCR

Množství DNA získané pomocí magnetických mikročastic a fenolovou extrakcí je uvedeno v Tabulce 30 Množství zbytkové DNA v supernatantech při aplikaci metody SPRI je uvedeno v Tabulce 31 Intenzity PCR produktů jsou vyhodnoceny v Tabulce 32 a agarosová gelová elektroforéza na Obrázku 18.

Tabulka 30: Vyhodnocení množství izolované DNA za použití magnetických mikročastic P(HEMA-co-GMA), magnetického skla a fenolovou extrakcí.

PEG (Mh)	PEG (%)	MN	DNA	Detekce DNA
600	8	P(HEMA-co-GMA)	E	-
600	8	MS	E	-
600	16	P(HEMA-co-GMA)	E	-
600	16	MS	E	-
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	E	-
6000	8	MS	E	-
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	E	-
6000	16	MS	E	-
-	-	-	FE	+

E – eluát

FE – DNA po fenolové extrakci

MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

- DNA nebyla detekována

+ DNA detekována v malém množství

Tabulka 31: Celkové zhodnocení množství DNA v supernatantech po adsorpci DNA na magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) a magnetické sklo.

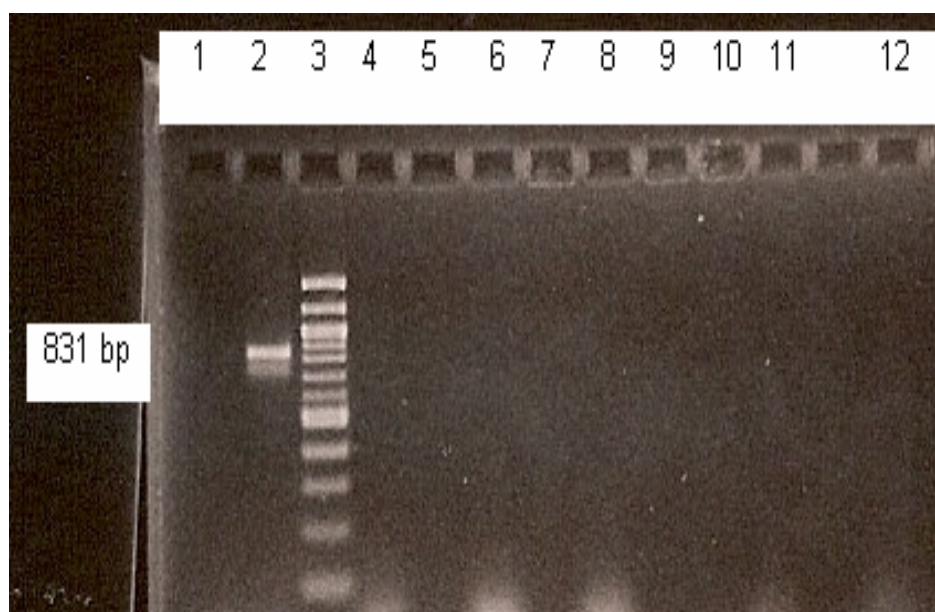
PEG (Mh)	PEG (%)	MN	Detekce DNA
600	8	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	+
600	8	MS	+
600	16	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	+
600	16	MS	+
6000	8	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	+
6000	8	MS	+
6000	16	P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	+
6000	16	MS	+

S – supernatant

MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

+ DNA detekována v malém množství



Obrázek 18: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktu (831 bp). Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běhy 4-11: DNA matrice získaná za různých podmínek separace pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-*co*-GMA) a magnetického skla, běh 12: DNA izolovaná fenolovou extrakcí.

Tabulka 32: Zhodnocení intenzit PCR produktů.

PEG Mh	PEG (%)	MN	DNA	Běh	Intenzita PCR produktu
600	8	P(HEMA-co-GMA)	E	4	-
600	8	MS	E	5	-
600	16	P(HEMA-co-GMA)	E	6	-
600	16	MS	E	7	-
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	E	8	-
6000	8	MS	E	9	-
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	E	10	-
6000	16	MS	E	11	-
-	-	-	FE	12	-

E – eluát

FE – DNA izolovaná fenolovou extrakcí

MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

- PCR produkt nebyl detekován

Spolu s magnetickou separací byla provedena i fenolová extrakce, která byla použita jako kontrola. Po fenolové extrakci byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA, která činila 39,95 ng/μl. DNA po fenolové extrakci byla po gelové elektroforéze detekována, po magnetické separaci DNA detekována nebyla.

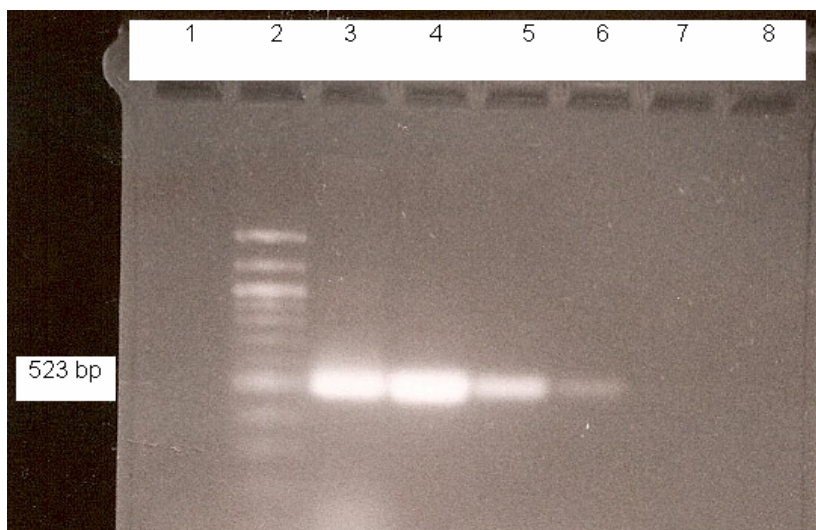
Následně byla provedena PCR, kde byly použity eluáty po magnetické separaci a DNA získaná fenolovou extrakcí. Přítomnost druhu *Bifidobacterium longum* nebyla opakovaně prokázána. U pozitivní kontroly, kde byla použita jako DNA matrice čistá DNA bakteriálního druhu *Bifidobacterium longum* o koncentraci 1 ng/μl, byla DNA amplifikována. Lze konstatovat, že ve vzorku tvrdého sýru nebyl druh *Bifidobacterium longum* detekován.

Jelikož nebyla přítomnost druhu *Bifidobacterium longum*, který měl tvrdý sýr obsahovat, byla provedena identifikace rodu *Bifidobacterium* a tak ověřeno, zda vzorek obsahuje bakterie rodu *Bifidobacterium*.

4.7.3 Identifikace rodu *Bifidobacterium* ve vzorku tvrdého sýru

4.7.4 Citlivost PCR

Byla provedena citlivost PCR, jenž probíhala dle programu KOK. Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů je na Obrázku 19, pod kterým je i uvedeno nanesení vzorků na gel.



Obrázek 19: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktu - citlivost PCR pro rod *Bifidobacterium*, program KOK.

Běh	DNA	Detekce PCR produktu
1	NK	-
2	100 bp žebříček	+
3	1 ng/μl	+
4	100 pg/μl	+
5	10 pg/μl	+
6	1 pg/μl	+
7	100 fg/μl	+
8	10 fg/μl	-

NK – negativní kontrola

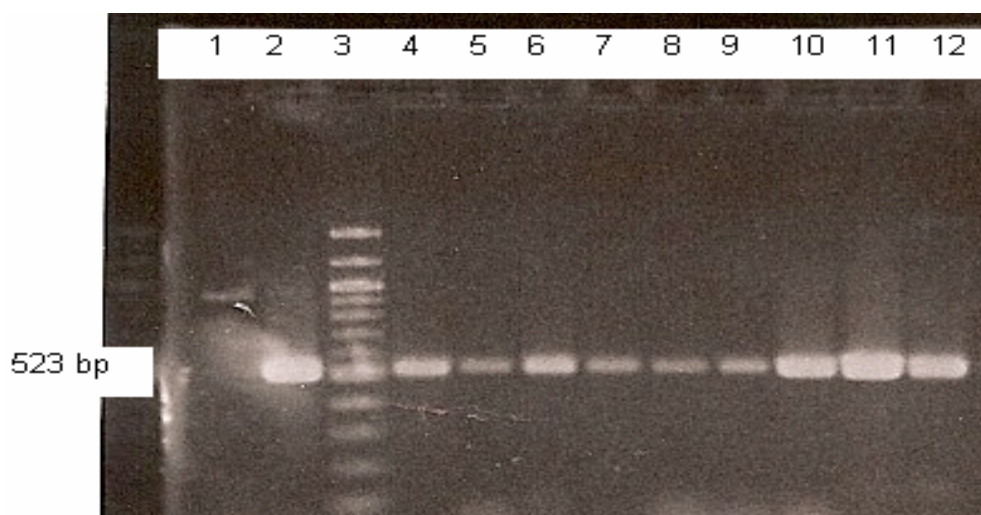
- PCR produkt nebyl detekován

+ PCR produkt detekován slabě

Citlivost PCR (program KOK), při které byly použity rodově specifické primery Bif164 a Bif662, byla 100 fg/μl DNA bakteriálního rodu *Bifidobacterium* ve výchozím vzorku.

4.7.5 Provedení PCR

Jako DNA matrice byly použity stejné eluáty a DNA získaná fenolovou extrakcí, jenž byly použity do PCR při identifikaci druhu *Bifidobacterium longum*. Intenzity PCR produktů jsou vyhodnoceny v Tabulce 33 a agarosová gelová elektroforéza PCR produktů je na Obrázku 20.



Obrázek 20: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktu (523 bp). Běh 1: negativní kontrola, běh 2: pozitivní kontrola, běhy 4 -11: DNA matrice získaná za různých podmínek separace pomocí magnetických mikročastic P(HEMA-co-GMA) a magnetického skla, běh 12: DNA, izolovaná fenolovou extrakcí.

Tabulka 33: Vyhodnocení průběhu PCR .

PEG (Mh)	PEG (%)	MN	DNA	Běh	Intenzita PCR produktu
600	8	P(HEMA-co-GMA)	E	4	++
600	8	MS	E	5	+
600	16	P(HEMA-co-GMA)	E	6	+
600	16	MS	E	7	+
6000	8	P(HEMA-co-GMA)	E	8	+
6000	8	MS	E	9	+
6000	16	P(HEMA-co-GMA)	E	10	+
6000	16	MS	E	11	+++
-	-	-	FE	12	++++

E – eluát

FE – DNA po fenolové extrakci

MN – magnetický nosič

MS – magnetické sklo

+ PCR produkt detekován slabě

++ PCR produkt detekován ve větším množství

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství

Přítomnost rodu *Bifidobacterium* byla ve vzorku tvrdého sýru prokázána. Dá se tedy usoudit, že druh přítomný v tvrdém sýru byl špatně druhově zařazen, a nejedná se tedy o bakteriální druh *Bifidobacterium longum*. Ale také je možné, že koncentrace DNA bakteriálního druhu *Bifidobacterium longum* byla tak nízká, že pomocí PCR nebyla amplifikována v detekovatelném množství. .

5 Závěr

Byl studován vliv PEG o různé molekulové hmotnosti a různé výsledné koncentraci v separační směsi na návratnost eluované DNA z kuřecích erytrocytů a purifikované bakteriální DNA (izolované z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 211/06) po jejich adsorpci na magnetické mikročástice P(HEMA-co-GMA) a částice magnetického skla. V případě DNA z kuřecích erytrocytů a DNA z čisté bakteriální kultury *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CCM 211/06 bylo použito spektrofotometrické stanovení pro zjištění návratnosti DNA. V obou případech se potvrdilo, že s rostoucí molekulovou hmotností a výslednou koncentrací PEG roste návratnost DNA. Navržený postup byl použit k izolaci bakteriální DNA z tekutých mléčných výrobků a vzorku tvrdého sýru. V případě tekutých mléčných výrobků bylo prokázáno, že magnetickou separací se z hrubých lyzátů buněk izoluje DNA v kvalitě vhodné pro PCR a ve výrobcích byly identifikovány cílové bakterie rodu *Lactobacillus* (předpokládaný výskyt). Se vzrůstající koncentrací použité DNA jako matrice vzrůstala i intenzita PCR produktů. Nejvyšší citlivost PCR byla docílena při použití PEG 6000 o koncentraci 16%.

Při analýze vzorku tvrdého sýru bylo zjištěno, že vzorek neobsahuje předpokládaný bakteriální druh *Bifidobacterium longum*. Pro izolaci DNA z hrubého lyzátu buněk ze vzorku byly použity magnetická separace za různých podmínek separace a klasická fenolová extrakce. Výše zmíněný druh nebyl identifikován i v případě, že byla jako matrice použita DNA získaná fenolovou extrakcí. Pomocí rodově specifické PCR byly ve vzorku identifikovány bakterie rodu *Bifidobacterium*.

Dále byl pro izolaci DNA z hrubých lyzátů bakteriálních buněk z tekutých mléčných výrobků použit vodný dvoufázový systém (kapalina-kapalina) s následnou adsorpcí DNA na magnetické nosiče s cílem odstranit vliv inhibitorů PCR. Odstranění těchto inhibitorů zvýšilo citlivost PCR. Uvedený postup je vhodným purifikačním krokem při identifikaci mikroorganismů v reálných vzorcích.

Závěrem lze konstatovat, že metoda magnetické separace DNA, ze systému PEG a chlorid sodný a dvoufázových vodných systémů, je vhodnou metodou pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR z reálných vzorků. Byly získány experimentální podklady pro další výzkum v dané oblasti.

6 Seznam literatury

- [1] Watson, J.D.: *Molekulární biologie genu*. 3. vydání. Praha: Československá akademie věd v Praze, 1982.
- [2] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. vydání. Praha: ACADEMIA, 2002. 180 s., 1. díl.
- [3] Campbell, N. A., Reece, J.B.: *Biologie*. 1. vydání. Brno: Computer Press,., 2006. ISBN 80-251-1178-4.
- [4] Voet, D.: *Biochemistry*. 3rd.ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. 1 591 s. ISBN 0-471-39223-5.
- [5] Salminen, S., von Wright, A.: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, 1998.
- [6] Stiles, M., E., Holzapfel, W., H.: *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. 1997.
- [7] Axelsson, L.: *Lactic Acid Bacteria: Clasification and Physiology*. In: Salminen, S., von Wright, A.: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, 1998.
- [8] Bibek, R.: *Fundamentals Food Microbiology*. 2nd edition. In: *CRC Press LLC*. New York: 2000. ISBN 0-8493-0045-2.
- [9] Gomes, A., M., P., Malcata, F., X.: *Bifidobacterium ssp. and actobacillus acidoplhilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probioticts*. Trends Food Sci. Technik. 10: 139-157. 1999.
- [10] Hammes, W.P., Vogel, R., F.: *The genus Lactobacillus*. In: Wood, B., J., B., Holzapfel, W., H.: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Vol. 2. Glasgow: Chapman & Hall, 1995.
- [11] Al-Soud, W.A., Radström, P.: *Capacity of nine thermostabel DNA polymerases to mediate DNA amplification in presence of PCR-inhibiting symplex*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3748-3753. 1998.
- [12] Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V.: *Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications*. Ann. Microbiol. 50:117-131. 2000.
- [12] Dráber, P., Petříček, M., Boubelík, M., Brdlička, R., Zadina, J.: *PCR a limitace její širší aplikace. Pokroky v PCR technologii a jejím využití. Pracovní materiály semináře*. Praha: Ústav molekulární genetiky AV ČR, 1993.
- [13] Gibson, J., R., McKee, R., A.: *PCR products generated from unpurified Salmonella DNA are degraded by thermostable nuklease scitivity*. Lett. Appl. Microbiol. 16: 59-61. 1993.

- [14] Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Kostíková, J.: *Metody molekulární biologie*. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [15] Gibson, J., R., Sutherland, K., Owen, R., J.: *Inhibition of DNA's activity in PFGE analysis of DNA from Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 19: 357-358. 1994.
- [16] Krčmář, M., Břicháček, B.: *Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví pro I. LF Praha, 1993. ISBN: 80-7013-143-8.
- [17] McDowell, D.: *PCR: Factors affecting reliability and validity*. In: Saunders, G., C., Parkes, H., C.: *Analytical molecular biology quality and validation*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1999.
- [18] Park, J.H., Um, J., L., Lee, B., J., Goh, J., S., Park, S., Y., Kim, W., S., Kim, P., H.: *Encapsulated Bifidobacterium bifidum potentiates intestinal IgA production*. 2002. Cell. Immunol. 219: 22-27.
- [19] *PCR Applications Manual*. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 1995.
- [20] Průša R.: *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. Praha: 2. LF UK a LAMBDA BIO-MED s.r.o., 1997. ISBN 80-238-0940-7.
- [21] Sambrook, J., Russell, D., W.: *Molecular cloning: A laboratory manual (I., II., III.)*, 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [22] Šafařík, I., Šafaříková, M.: *Use of magnetic techniques for the isolation of cells*. J. Chromatogr. B 722: 33-53. 1999.
- [23] Španová, A., Horák, D., Soudková, E., Ditrich, B.: *Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications*. J. Chromatogr. B 800: 27-32. 2004.
- [24] Vaughan, E., E., de Vries, M., C., Zoetendal, E., G., Ben-Amor, K., Akkermans, A., D., L., de Vos, W., M.: *Intestinal LABs*. Antonie van Leeuwenhoek 82: 341-352.
- [25] Wilson, I., G.: *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3741-3751. 1997.
- [26] Yoza, B., Matsumoto, M., Matsunaga, T.: *DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound*. J. Biotech. 94: 217-224. 2002.
- [27] Julák, J.: *Identifikace bakterií metodami instrumentální analýzy*. Praha: 1997. ISBN 80-7184-451-9.
- [28] Johansson, H., O., Karlström, G., Tjerneld, F.: *Temperature-induced phase partitioning of peptides in water solutions of ethylene oxide and propylene oxide random copolymers*. Biochemica Biophysica Acta 1335, 315-325. 1997.

- [29] Persson, J., Johansson, H., O., Galaev, I., Mattiasson, B., Tjerneld, F.: *Aqueous polymer two-phase systems formed by new thermoseparating polymers*. Bioseparation 9, 105-116. 2000.
- [30] Xin, X., Madeira, P., P., Macedo, E., A.: *Representation of liquid-liquid equilibria for polymer-salt aqueous two-phase systems*. Chemical Engineering Science 59, 1153-1159. 2004.
- [31] Křížová, J., Španová, A., Rittich, B., Horák, D.: *Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation*. J. Chromatogr. A, 1064, 247-253. 2004.
- [32] Kleideiter, G., Nordmeier, E.: *Poly(ethyleneglycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions, Part I. Theoretical considerations*. Polymer 40, 4013-4023. 1998.
- [33] Vasilevskaya, V., V., Khokhlov, A., R., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K.: *Collapse of single DNA molecule in poly(ethyleneglycol) solutions*. J. Chem. Phys., Vol. 102, No. 16. 1995.